

**UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-SYNTHESE
IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN,
REGENERIERENDEN RATTENLEBER**

Attila F. Galosi

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0023

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-SYNTHESE
IN DER
ISOLIERT PERFUNDIERTEN, REGENERIERENDEN RATTENLEBER



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und dem Fachbereich Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Attila F. Galosi

aus Augsburg

1977



Referent : Prof. Dr. med. Hartmut Rabes
Korreferent : Prof. Dr. med. Max Eder
Dekan : Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 28. Februar 1978

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.med.H.M. Rabes danke ich für die Themenstellung, für die Unterstützung dieser Arbeit und für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Besonderen Dank zolle ich Herrn Professor Dr.med. R.Scholz, der mir zur Durchführung der Experimente ein Perfusionsgerät zur Verfügung stellte.

Mit großem Dank gedenke ich der qualifizierten Unterstützung durch die Arbeitskreise der Professoren Dr. H.M.Rabes und Dr. R.Scholz, vornehmlich Fräulein R.Kerler, Fräulein U.Schwabe und Herrn A. Schallweg, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre. Herrn H. Hampe und Frau L.Döhle danke ich für die phototechnischen Arbeiten.

Die experimentellen Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, durchgeführt.

Abkürzungen

G ₁	Präsynthese-Phase
G ₂	Prämitose-Phase
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Glu-DH	Glutamat-Dehydrogenase
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
β-HBDH	β-Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
HU	Hydroxyharnstoff
i. p.	intraperitoneal
KH	Krebs-Henseleit-Lösung
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MF	mittlerer Fehler des Mittelwertes
MI	Markierungsindex
rpm	Umdrehungszahl pro Minute
S	DNA-Synthese-Phase
t _C	Zellzykluszeit
TRA	Triäthanolamin
³ H-TdR	6- ³ H-Thymidin
¹⁴ C-TdR	2- ¹⁴ C-Thymidin
Ci	Curie (1 Curie = 3.7 x 10 ¹⁰ Zerfälle pro Sekunde)

Material und Firmen

Filter (Scrynel NY 85 DH)	Zürcher Beuteltuch-Fabrik AG
Perfusor	Nr. 4, Braun, Melsungen
Perfusor-Spritzen	Nr. 72877, Braun, Melsungen
Perfusor-Infusionsleitungen	Nr. 72295, Braun, Melsungen
Perfusor-Besteck	Nr. 72500, Braun, Melsungen
Hydroxyharnstoff	HU reinst, Serva Feinbiochemika, Heidelberg
^3H -Thymidin	$6\text{-}^3\text{H}$ -Thymidin, spez. Aktivität 5 Ci/mMol, The Radiochemical Centre, Amersham
^{14}C -Thymidin	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -Thymidin, Spez. Aktivität 57 mCi/mMol, The Radiochemical Centre, Amersham
Autoradiographiefilme	Kodak, Stripping AR. 10, Kodak AG, Stuttgart und Ilford K2 Emulsion, Ilford, Essex
Szintillationszähler Tricarb 3214	Packard Instrument, Downers Grove, Illinois
Rückstandslos verbrennendes Filterpapier	Selecta, Schwarzband, Schleicher & Schüll
Gelatinekapseln	Nr. 5, Park-Davis, Detroit
Albumin aus Rinderserum	Serva, Feinbiochemika Heidelberg Cohn-Fraktion V, Nr. 11930
TC Medium Ham F-10	dried, Difco, Detroit
Dialysierschlauch	Nr. 0056/4, Kalle AG
ATP	Dinatrium-Salz, Boehringer, Mannheim
ADP	Dinatrium-Salz, Boehringer, Mannheim

Nembutal	Pentobarbital-Na (50 mg/ml), Deutsche Abbott GmbH
Altinsulin vom Schwein	Hoechst
RBS 50	Roth OHG, Karlsruhe
Hexokinase aus Hefe	10 mg HK in 1 ml 3.2 M Ammoniumsulfat- Lösung, Boehringer, Mannheim
G-6-P-DH	5 mg in 1 ml 3.2 M Ammoniumsulfat- Lösung, Boehringer, Mannheim
Triäthanol-hydrochlorid	Boehringer, Mannheim
Lacat-Dehydrogenase aus Schweineherz	5 mg in 1 ml 3.2 M Ammoniumsulfat- Lösung, Boehringer, Mannheim
Glycin	Boehringer, Mannheim
β -Hydroxy-Butyrat-DH	10 mg in 2 ml 3.2 M Ammoniumsulfat- Lösung, Boehringer, Mannheim
Hydroxymethyl-Aminomethan- Ketoglutarat	Boehringer, Mannheim
EDTA	Boehringer, Mannheim
Glutamat-DH	100 mg in 10 ml Glycin, Boehringer, Mannheim
Hydrazin-Hydrat	Roth
TCM 199	Difco, Detroit
Urease	Lyophilisat (100 mg enthalten 25 mg Enzym- protein, ca 60 mg Saccharose und ca 15 mg Citrat), Boehringer, Mannheim
β -Nicotinamid-adenin- dinucleotid	lyophilisierte, freie Säure, Boehringer, Mannheim
NADP	Dinatrium-Salz, Boehringer, Mannheim

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Methode der Leberperfusion	3
2.1. Möglichkeiten der hämoglobinfreien Leberperfusion	3
2.2. Entwicklung des Systems	3
2.3. Perfusionsapparatur	4
2.4. Präparation der Leber für die Perfusion	5
2.5. Perfusionslösungen	9
2.6. Bedingungen der isolierten Leber im Perfusionsexperiment	10
3. Bestimmung der DNA-Synthese der regenerierenden Rattenleber im Perfusionsexperiment	11
3.1. Proliferation von Hepatozyten in der adulten Rattenleber nach partieller Hepatektomie in vivo	11
3.2. Proliferation der adulten, regenerierenden Rattenleber im Perfusionsexperiment	12
3.2.1. Methodik	13
3.2.1.1. Tiermaterial und Operation	13
3.2.1.2. Technik der Perfusion regenerierenden Rattenleber	13
3.2.1.3. Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen	13
3.2.1.3.1. Applikation der radioaktiven Verbindungen in vivo	14
3.2.1.3.2. Zugabe von ^3H -TdR zum Perfusat	14
3.2.1.4. Perfusatwechsel bei mehrstündigen Perfusionen	15
3.2.1.5. Beendigung des Versuches	15
3.2.1.6. Autoradiographie	16
3.2.1.7. Auswertung der Autoradiogramme	17
3.2.1.8. Bestimmung des inkorporierten ^3H -TdR	17
3.2.2. Nachweis der DNA-Synthese der teilresezierten Rattenleber unter den Bedingungen der Perfusion	19
3.2.2.1. Versuchsanordnung	19
3.2.2.2. Ergebnisse	19
3.2.2.3. Diskussion	23
3.2.3. Untersuchungen zum Übertritt der Hepatozyten vom G_1 - in das S-Kompartiment im Perfusionssystem	25
3.2.3.1. Erörterung des Problems	25
3.2.3.2. Versuchsanordnung	26

	Seite
3.2.3.3. Ergebnisse	26
3.2.3.3.1. DNA-Synthese nach 3-Stunden-Perfusion in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Organisolierung nach partieller Hepatektomie	26
3.2.3.3.2. DNA-Synthese nach 5-Stunden-Perfusion in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Organisolierung nach partieller Hepatektomie	27
3.2.3.3.3. DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Dauer der Perfusion der siebzehn oder zweiundzwanzig Stunden nach partieller Hepatektomie untersuchten Leber	27
3.2.3.4. Diskussion	28
3.2.4. Untersuchungen zur Beeinflußbarkeit des Übertritts von Hepatozyten aus dem G_1 - in das S-Kompartiment	37
3.2.4.1. Material und Methoden	38
3.2.4.1.1. Tiermaterial, Operation und Bestimmungsmethoden	38
3.2.4.1.2. Technik der Perfusion	38
3.2.4.1.3. Perfusionslösungen	38
3.2.4.1.3.1. Perfusionsmedium mit TCM 199	38
3.2.4.1.3.2. Perfusionsmedium mit Ham F-10	39
3.2.4.1.3.3. Krebs-Henseleit-Glucose-Insulin-Perfusat	39
3.2.4.1.4. Kontinuierliche Zugabe von Insulin ins Perfusat	40
3.2.4.2. Versuchsanordnung	40
3.2.4.2.1. Durchströmung mit Perfusat unterschiedlicher Zusammensetzung	40
3.2.4.2.2. Perfusionen mit kontinuierliche Zugabe von Insulin ins Perfusat	41
3.2.4.3. Ergebnisse	44
3.2.4.3.1. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts der Hepatozyten regenerierender Leber durch modifizierte Perfusionsmedien	44
3.2.4.3.2. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts durch Perfusion am offenen System	45
3.2.4.3.3. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts durch kontinuierliche Zufuhr von Insulin ins Perfusat	45
3.2.4.4. Diskussion	48
4. Radioaktivität im Perfusat	52
4.1. Veränderungen der Radioaktivität im Perfusat	52
4.2. Methodik	52
4.2.1. Tiermaterial, Operation und Bestimmungsmethoden	52
4.2.2. Probenahme für die Radioaktivitätsbestimmung	53
4.3. Versuchsanordnung	54
4.4. Ergebnisse	55
4.4.1. Veränderungen der Gesamtradioaktivität im Perfusat (60 ml) während 30 min nach Zugabe von 200 μ Ci 3 H-TdR	55

	<u>Seite</u>
4.4.2. Verfügbarkeit von ^3H -TdR für den Einbau in die DNA nach 30minütiger Perfusion	56
4.4.3. Kinetik der Radioaktivitätsfreisetzung aus der vormarkierten, regenerierenden Leber während offener Perfusion	56
4.4.4. Radioaktivitätsabgabe der Leber in das Perfusat im geschlossenen System	57
4.5. Diskussion	61
5. Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber im Perfusionssystem nach Hydroxyharnstoff- (HU)-Dauerbehandlung in vivo	63
5.1. Erörterung des Problems	63
5.2. Methodik	64
5.2.1. Tiermaterial, Operation, Radioaktivitätszugabe, Bestimmungsmethoden und Technik der Organperfusion	64
5.2.2. Technik der Hydroxyharnstoff-Behandlung	64
5.2.2.1. Zeitpunkt des Beginns der HU-Applikation	64
5.2.2.2. Applikation von Hydroxyharnstoff	65
5.2.2.2.1. Zuführung von HU in vivo	65
5.2.2.2.1.1. Vorinjektion von Hydroxyharnstoff	65
5.2.2.2.1.2. Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff	66
5.2.2.2.2. Zugabe von Hydroxyharnstoff zur Perfusionslösung	66
5.3. Vorversuch	66
5.3.1. Versuchsaufbau	67
5.3.2. Ergebnisse	68
5.3.2.1. DNA-Synthese im Perfusionssystem nach Aufhebung des HU-Blockes	68
5.3.2.2. Infusionsdauer: 14.-20.5 Stunde nach partieller Hepatektomie	68
5.3.2.3. Infusionsdauer: 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie mit Hydroxyharnstoff für 60 Minuten im Perfusat	69
5.3.2.4. Infusionsdauer: 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie ohne HU im Perfusat	69
5.3.2.5. Beziehung zwischen Hydroxyharnstoff-Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen	69
5.3.2.6. Hemmungsgrad der DNA-Synthese im Perfusionssystem durch Perfusion mit Hydroxyharnstoff im Perfusat	70
5.3.3. Diskussion	70
5.4. Hauptversuch	73
5.4.1. Versuchsanordnung	73
5.4.2. Ergebnisse	74
5.4.2.1. Reversibilität der gehemmten DNA-Synthese im Perfusionssystem nach Aufhebung des HU-Blockes (Dosis: $2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$)	74
5.4.2.2. Infusionsdauer von Hydroxyharnstoff von der 14. bis 22. Stunde nach Teilresektion und anschließende Leberperfusion von unterschiedlicher Dauer	74

	Seite
5.4.2.3. Infusionsdauer von Hydroxyharnstoff von der 14. bis 30. Stunde nach Teilresektion und anschließende Leberperfusion von unterschiedlicher Dauer	75
5.4.2.4. Perfusionen nach 2stündigem Intervall zwischen Absetzen der HU-Dauerinfusion und dem Beginn des Durchströmungsversuches	75
5.4.2.5. Bestimmung der DNA-Synthese-Rate nach Hydroxyharnstoff-Infusion von der 14. bis 30. Stunde nach partieller Hepatektomie und anschließende Leberperfusion	76
5.4.2.6. Beziehung zwischen Hydroxyharnstoff-Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen	76
5.4.2.7. Hemmungsgrad der DNA-Synthese durch Perfusion mit HU (2.5 mM) im Perfusat nach HU-Dauerinfusion	77
5.4.2.8. Nachweis des Sauerstoffs als notwendiger Faktor der DNA-Synthese	77
5.4.3 Diskussion	83
6. Metabolite im Perfusat	89
6.1. Einleitung	89
6.2. Material und Methode	89
6.2.1. Tiermaterial, Operation und Leberperfusion	89
6.2.2. Probeentnahme und Enteiweißung	90
6.2.3. Prinzip des optischen Tests nach Warburg	90
6.2.4. Zusammensetzung der einzelnen Tests	91
6.2.4.1. Glucose-Bestimmung	91
6.2.4.2. Pyruvat-Bestimmung	92
6.2.4.3. Lactat-Bestimmung	92
6.2.4.4. Acetoacetat-Bestimmung	92
6.2.4.5. β -Hydroxy-Butyrat-Bestimmung	93
6.2.4.6. Ammoniak- und Harnstoff-Bestimmung	93
6.3. Ergebnisse	94
6.3.1. Glucose-Freisetzung ins Perfusat	94
6.3.2. Lactat- und Pyruvat-Freisetzung in das Perfusat	96
6.3.3. Harnstoff-Ausschüttung und Ammoniak-Abgabe in das Perfusat	99
6.3.4. Ketogenese	99
6.3.5. Änderungen im Redoxzustand der Leber	104
6.4. Diskussion	105
7. Zusammenfassende Diskussion	112
8. Zusammenfassung	116
9. Literaturverzeichnis	120

1. Einleitung

Der adulte Organismus stellt das Ergebnis regulierter Zellproliferation dar.

Dysregulationen führen zur Verminderung (Atrophie), zur Vermehrung (Hypertrophie oder Hyperplasie) oder zur qualitativen Störung des Zellwachstums (Geschwulstbildung).

Prinzipien der Regulationsprozesse im Wachstum von hormongesteuerten Organen wurden erforscht (z.B. Mangel an Jod oder vermehrte Sekretion von thyreotropem Hormon der Hypophyse induzieren Strumabildung). Dagegen sind die Regulationsmechanismen der nicht-hormongesteuerten Organe weitgehend unbekannt.

Die unbehandelte, adulte Leber ist für das Studium von Grundprinzipien homöostatischer Mechanismen besonders geeignet. Sie ist durch den außerordentlich geringen Zellumsatz ihrer reversibel postmitotischen Zellen gekennzeichnet. Die Induktion der Reversibilität gelingt durch einen adäquaten Reiz, die Teilhepatektomie. Entfernung von zwei Drittel des Lebergewebes führt zur Zellneubildung im Restorgan.

Die Steuerung dieser Prozesse im Hinblick auf wachstumsfördernde oder vermindert wachstumshemmende Mechanismen ist umstritten.

Untersuchungen zur Erforschung der vorliegenden Gesetzmäßigkeiten werden durch die heterogenen Stoffwechselfunktionen der Leber erschwert.

Die isolierte Leberperfusion dient zur Vereinfachung und Standardisierung dieses komplexen Modells. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungsmethoden, zum Beispiel von Zellfraktionen und Homogenaten, bleibt hierbei die morphologische Organisation erhalten.

Die 1963-64 von Scholz und Bücher entwickelte hämoglobinfreie Leberperfusion wurde bisher für die Darstellung physiologischer Stoffwechselwege verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe der isolierten Perfusion von regenerierenden Lebern ein möglicher Regulationspunkt im Wachstumsprozess, der Übertritt von Zellen aus der Präsynthese- in die DNA-Synthese-Phase, untersucht.

2. Methode der Leberperfusion

2.1. Möglichkeiten der hämoglobinfreien Leberperfusion

Die Durchströmung isolierter, überlebender Organe ist eine geeignete Methode für die Untersuchung von Stoffwechselvorgängen. In einem solchermaßen behandelten Gewebe ist die anatomische Struktur gewahrt. Das isoliert perfundierte Organ ist den Interferenzen mit dem Gesamtorganismus entzogen. Dadurch kann es gezielten, reproduzierbaren Versuchsbedingungen unterworfen werden. Für die Aufklärung von Grundprinzipien physiologischer Stoffwechselvorgänge bietet dieses Modell bessere Möglichkeiten als die Verwendung von Gewebsschnitten, Zellfraktionen oder Homogenaten (Scholz 1967).

2.2. Entwicklung des Systems

Perfusionen von isolierten Lebern wurden erstmals 1902 erwähnt (Embden und Glaessner 1902). In die physiologisch-chemische Methodik wurde die Durchströmung isolierter Rattenlebern 1941 von Corey und Britten und von Trowell eingeführt. 1951 wandten sich gleichzeitig die Arbeitsgruppen von Brauer und Miller dieser Methode zu. Während Miller als Perfusionsmedium heparinisiertes Rattenblut verwendete, benützte Schimassek später ein halbsynthetisches Medium (Salzlösung, Rinderalbumin, gewaschene Rindererythrozyten) (Schimassek 1962). Um die Komplexität des Systems weiter einzuschränken, entwickelten

Scholz und Bücher 1963-64 die Methode der hämoglobinfreien Leberperfusion (Scholz und Bücher 1965, Scholz 1967). Als Blutersatz diente ihnen eine Salzlösung mit Plasmaexpander. Hierbei wird auf das Hämoglobin der Erythrozyten als Träger des Sauerstoffs verzichtet. Die Sauerstoffversorgung wird durch eine gegenüber den physiologischen Werten erhöhte Durchströmungsgeschwindigkeit gewährleistet, durch welche die Konzentration des physikalisch gelösten Sauerstoffs ausreichend hoch gehalten werden kann.

2.3. Perfusionsapparatur

Die Leber kann mit rezirkulierendem (geschlossenes System) oder mit nicht rezirkulierendem Perfusat (offenes System) durchströmt werden. Das offene System wird verwendet, um arteriovenöse Unterschiede von Metaboliten bei definierter Zusammensetzung des Perfusats messen zu können. Dagegen bewährt sich das geschlossene System, wenn komplizierte Syntheseleistungen der Leber bestimmt werden sollen, die durch ein von der Leber mitreguliertes Milieu ermöglicht werden.

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Perfusionsapparatur. Entscheidend in der technischen Konzeption ist der Diffusionsoxygenator. Er besitzt an der Außenseite seines auf 37°C temperierten Aluminiumkerns zwei durch einen Silikon-

Kautschuk-Schlauch getrennte Räume. Im Inneren des 9 Meter langen und 0.2 Zentimeter dicken, für Gase permeablen Schlauches fließt das Perfusionsmedium. Es wird durch das im Gegenstrom aufsteigende Gas-Gemisch mit 95 % Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd aufgesättigt. Die Länge des Schlauchsystems ist ausreichend, um bei der üblichen Flußgeschwindigkeit des Perfusats von 30-40 ml/min einen Sättigungsgrad von 99 % zu erzielen (Zimmer 1973).

Durch eine Rollenpumpe wird das Perfusionsmedium auf die notwendige Flußgeschwindigkeit gebracht. Die bei den Versuchen verwendete Größe des Durchflusses betrug 1.68 - 2.28 Liter Perfusat pro Stunde.

Über einen Vierwegehahn kann aus einem Vorratsgefäß bei Perfusionsbeginn und bei Perfusatwechsel ein temperiertes, sauerstoffreiches, genau definiertes Perfusionsmedium angeboten werden. Gleichzeitig kann durch die Umschaltung das verbrauchte Medium abgeführt und verworfen werden. Mit Hilfe eines Perfusors, der unmittelbar vor der Leber in die Flußbahn des Perfusionssystems eingesetzt ist, lassen sich der Perfusionslösung definierte Mengen eines Substrats pro Zeiteinheit zuführen.

2.4. Präparation der Leber für die Perfusion

Die Organisolierung erfolgte nach der von Miller (Miller et al. 1951), Schimasek (1963) und Goebell (1959) beschriebenen Operationstechnik.

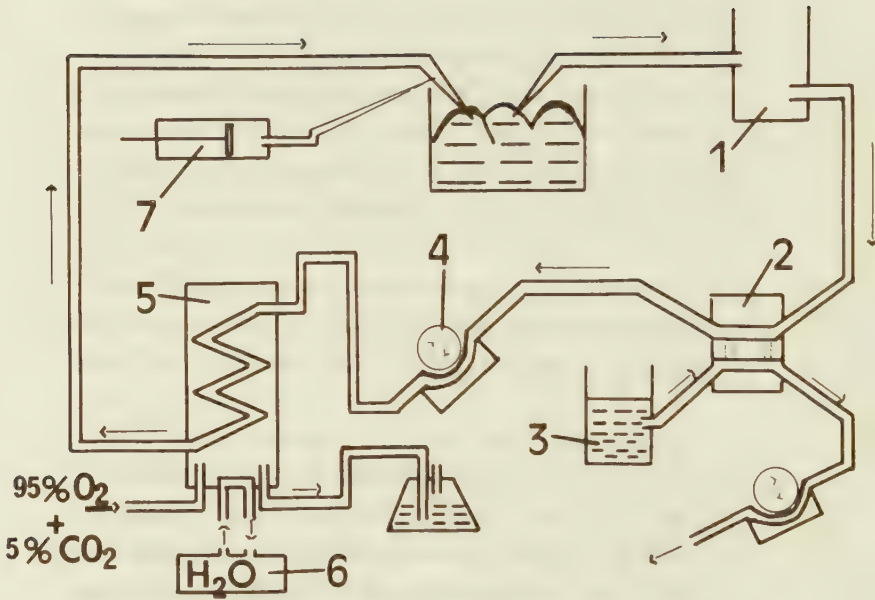


Abb. 1 Perfusionsapparat mit Diffusionsoxygenator

(1) Sammelgefäß, (2) Vierwegehahn, (3) Vorratsgefäß
(4) Infusionspumpe mit Motor, (5) Diffusionsoxygenator
(6) Thermostat, (7) Perfusor für kontinuierliche Zugabe
von Substrat zum Perfusat (umgezeichnet nach Zimmer
1973 und Braun 1977)

Vor Operationsbeginn wurde den Ratten zur Narkose Nembutal (5 mg/100 g KG) i.p. injiziert. Zur Organisolierung wurde das Abdomen durch einen Medianschnitt eröffnet. Der Magen wurde durch Trennung des Ligamentum gastroduodenale und des Ligamentum gastrolienale freipräpariert. Es folgte eine distale Ligatur des Ösophagus, der anschließend vom Magen abgetrennt wurde. Danach wurden Darmschlingen und Magen zur Seite geschoben. Eine lockere Ligatur wurde um die Vena cava dicht oberhalb der Einmündung der Nierenvenen gelegt. Ebenso wurde die Pfortader mit zwei losen Ligaturen umschlungen, wobei der zum Lebergewebe am nächsten gelegene Zufluß (Milzvene) mit erfaßt werden mußte. Dann folgte eine Incision der Vena portae, um eine Kunststoffkanüle (Durchmesser innen 1.0 mm, außen 1.4 mm) am Ende des arteriellen Perfusionsschlauches einzuführen. Durch die vorbereiteten Ligaturen um die Pfortader wurde die Kanüle fixiert. Die Perfusionspumpe lief hierbei mit der Geschwindigkeit von 10 - 15 ml/min. Dieser Durchfluß entspricht der physiologischen Leberdurchblutung (Fischer et al. 1958). Zwei bis drei Sekunden nach Einströmen der Perfusionslösung zeigte die Leber ihre gelblich-braune Eigenfarbe. Dann wurde die Vena cava inf. ligiert.

Im nächsten Operationsabschnitt folgte die Eröffnung des Thorax in der Parasternallinie. Durch das rechte Herzohr wurde eine Polyäthylenkanüle (Durchmesser innen 1.5 mm, außen 2.0 mm) durch die Vena cava inf. bis in den Bereich der Vv. hepaticae geführt. Durch die Kanüle erfolgte der venöse Abfluß des Perfusats aus der Leber zum

Oxygenator. Die eingelegte Kanüle wurde zusammen mit einem Zwerchfellzipfel eingebunden.

Da die Leber nun dem Kreislauf der Ratte entzogen war, wurde die Geschwindigkeit des Perfusionsflusses zur ausreichenden Oxygenierung des Organs auf 25 - 38 ml/min erhöht. Nach Durchtrennung des Ligamentum falciforme, des Lig. hepatoduodenale, des Lig. hepatorenale sowie der Ligamenta triangularia wurde die Leber aus dem Situs entnommen und an den Perfusionsschläuchen, die als arterielle Zufluß- und venöse Abflußbahn dienten, im Perfusions-system hängend fixiert.

Die Operation dauerte etwa 7 - 8 Minuten. Nur während des etwa zweiminütigen Intervalls vom Einführen der Pfortader-Kanüle ab bis zum Einbinden der Cava-Kanüle war mit einer Hypoxie zu rechnen. Eine makroskopisch sichtbare Schwellung war in diesem Zeitraum nicht nachweisbar. Vom Zeitpunkt der Kanülierung der unteren Hohlvene ab war die Leber mit Sauerstoff ausreichend versorgt. Um Spuren des zur Narkose verwendeten Barbiturats auszuspülen, wurde das Perfusat im offenen System zunächst abgeleitet, bevor es nach etwa 4 - 5 min für die Rezirkulation geschlossen wurde. Um Verunreinigung durch Luftkeime zu vermeiden, wurde das Untersuchungsgefäß, in dem die Leber aufbewahrt war, mit Parafilm zeltförmig abgedeckt.

Als wichtiger Unterschied zu der von Miller (Miller et al. 1951) und Schimassek (1963) beschriebenen Operationstechnik wird bei der Methode von Scholz (1967) die Durchströmung der Leber nicht unter-

brochen. Dadurch lassen sich Ischaemien von 4-12 min Dauer (Schimassek 1963, Boden und Willms 1966) vermeiden. Die Hypoxie der Leber wird auf maximal zwei Minuten beschränkt.

2.5. Perfusionslösungen

Das Perfusionsmedium bestand aus einer Elektrolytlösung, wie sie erstmals von Krebs und Henseleit beschrieben wurde (1932) (Tabelle 1). Als zusätzliche Puffersubstanz wurde Rinderserum-Albumin (Cohn-Fraktion V), das zuvor zweimal dialysiert wurde, in einer Endkonzentration von 4 g/100 ml zur Perfusionslösung hinzugegeben.

In einigen Perfusions-Experimenten wurde von dieser Standardlösung abgegangen. Grund und Art der Änderung sind in den jeweiligen Versuchen vermerkt.

Im Diffusionsoxygenator wurden die Perfusionslösungen mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 äquilibriert. Durch die Konzentration von 25 mM $NaHCO_3$ im Medium und 5 % CO_2 im Gasgemisch war eine ausreichende Pufferkapazität gewährleistet. Durch den Bicarbonatpuffer war der pH-Wert der Lösungen auf 7.4 eingestellt. Im geschlossenen System betrug das Volumen des Perfusats etwa 55-65 ml.

Tab. 1 Krebs-Henseleit-Lösung

NaCl	6.72 g/l	MgCl ₂	0.24 g/l
NaHCO ₃	2.10 g/l	NaH ₂ PO ₄	0.17 g/l
KCl	0.44 g/l	CaCl ₂	0.37 g/l
Na ₂ SO ₄	0.17 g/l		

2.6. Bedingungen der isolierten Leber im Perfusionsexperiment

Intracorporal versorgen die Vena portae und die Arteria hepatica die Leber mit Blut. Die Vereinigung beider Gefäßsysteme erfolgt am Anfangsteil oder innerhalb der sinusoidalen Gefäßstrecke. Über die Venae hepaticae wird das Blut abgeleitet. Nach Fischer et al. (1961) wird ungefähr 40 % des Sauerstoffbedarfs der Leber aus der Arteria hepatica gedeckt. Die Arterie versorgt keine selektiven Leberbezirke. Ihre Aufgabe ist die Sauerstoffanreicherung des venösen Pfortader-Blutes. Da eine ausreichende O₂-Sättigung durch das portal zugeführte Perfusat zu erreichen ist, konnte im Perfusionsexperiment auf den Zustrom von der Arteria hepatica verzichtet werden (Zimmer 1973).

3. Bestimmung der DNA-Synthese der regenerierenden Rattenleber im Perfusionssystem

3.1. Proliferation von Hepatozyten in der adulten Rattenleber nach partieller Hepatektomie in vivo

Die adulte Rattenleber zeigt eine geringe Zellproliferation (Schultze und Oehlert 1960, Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968).

Durch die von Higgins und Anderson (1931) standardisierte partielle Resektion kann die Umschaltung in eine erhöhte Proliferation aktiv erreicht werden (Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968). Die Steigerung der Wachstumsfraktion (Mendelsohn 1960) tritt nach einer Latenz von 15 bis 18 Stunden nach dem operativen Eingriff ein (Grisham 1960, Stöcker 1966, Tuczek und Rabes 1973). Zur 24. Stunde ist ein erster Gipfel in der Anzahl DNA-synthetisierender Zellen zu beobachten (Grisham 1960, Fabrikant 1969, Rabes und Brändle 1969). Für die identische Reduplikation des genetischen Materials benötigt die Leberzelle durchschnittlich 7.5 - 8.5 Stunden (Looney 1960, Stöcker 1966, Rabes et al. 1972).

Die Erhöhung des Proliferationsmodus macht die Leber zellkinetischen Betrachtungen zugänglich (Bucher 1963, Howard und Pelc 1953, Wirsching 1974).

Eine der möglichen Regulationspunkte des Wachstums ist der Übertritt

von Zellen aus dem Präsynthese (G_1) - in das DNA-Synthese (S)-Kompartiment. Der Eintritt von Hepatozyten in das S-Kompartiment läßt sich durch den Einbau radioaktiver Vorläufer der DNA-Synthese kennzeichnen. Hierbei war die Einführung von Tritium-markiertem Thymidin ein entscheidender Fortschritt (Reichard und Estborn 1951). Diese Substanz wird während der S-Phase in die DNA eingebaut (Schultze und Oehlert 1960) und kann damit zur Bestimmung dieses Zellzyklusabschnittes verwendet werden. Da die Reichweite der β -Strahlung gering ist (mittlere Energie 0.006 MeV) läßt sich der Einbau in die DNA im Autoradiogramm bei geeigneter Emulsion punktförmig fast ausschließlich über dem Zellkern lokalisieren (Schultze 1968). Doppelmarkierungen mit ^3H - oder ^{14}C -Thymidin geben zusätzlich Aufschluß über die Dauer der DNA-Synthese (Pilgrim und Maurer 1962, Wimber und Quastler 1963). Durch die 10fach größere β -Energie des ^{14}C -Thymidins liegen die Markierungskörner nicht wie beim ^3H -Thymidin auf eine dünne Schicht der Emulsion begrenzt, sondern erzeugen Bahns Spuren, die bis in die oberste Schicht der Emulsion verfolgt werden können.

Die zunächst durchgeführten Experimente galten der Persistenz dieser aus in vivo-Untersuchungen erhaltenen Befunde nach Übernahme der Leber ins Perfusionssystem.

3.2 Proliferation der adulten, regenerierenden Rattenleber im Perfusionssystem

Im folgenden Kapitel wurden die Intaktheit der DNA-Synthese-Leistung,

deren zeitlicher Beginn nach Zweidrittelhepatektomie und der Influx von Hepatozyten in das S-Kompartiment unter den Bedingungen der isolierten Leberperfusion untersucht.

3.2.1. Methodik

3.2.1.1. Tiermaterial und Operation

Als Versuchstiere wurden männliche Wistarratten (AF/Han) eigener Zucht im Gewicht von 182-204 g verwendet. Diese Tiere haben das postnatale Organwachstum bereits abgeschlossen. Ihr Stoffwechsel ist auf das physiologische niedrigere Ersatzwachstum eingestellt. Die Aufzucht erfolgte unter Standardbedingungen: Temperatur (22°C) und Luftfeuchtigkeit (65%) waren konstant. Im normalen Licht-Dunkel-Rhythmus erhielten die Tiere Wasser und Standarddiät (Altromin) ad libitum. Die partielle Hepatektomie wurde in der von Higgins und Anderson beschriebenen Methode (1931) in Äthernarkose durchgeführt.

3.2.1.2. Technik der Perfusion regenerierender Rattenleber

Bei der Isolierung und Durchströmung der teilresezierten Leber wurde nach der unter 2.4. beschriebenen Technik vorgegangen.

3.2.1.3. Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen

Als Meßgröße zur Beurteilung der DNA-Synthese der isoliert perfundierten,

regenerierenden Leber wurde ^3H -Thymin oder bei Doppelmarkierung ^3H -Thymin und ^{14}C -Thymin verwendet. Der Zeitpunkt der Markierung war vom jeweiligen Versuchsplan abhängig und ist dort angegeben.

3.2.1.3.1. Applikation der radioaktiven Verbindungen in vivo

Die intraperitoneale Injektion von ^3H -Thymin wurde mit der Dosis von $0.8 \mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht durchgeführt. War im Experiment eine ^{14}C -TdR-Markierung beabsichtigt, so wurde eine Dosis von $0.1 \mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht injiziert.

Zur Herstellung der Injektionslösung mit ^3H -TdR wurde 1 ml der vom Hersteller gelieferten Lösung (1 mCi/ml) mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (Endkonzentration 0.2 mCi/ml). Die Injektionslösung zur ^{14}C -TdR-Markierung bestand aus 0.4 ml der vom Hersteller gelieferten Lösung (57 mCi/mMol) und 0.6 ml physiologischer NaCl-Lösung (Endkonzentration $20 \mu\text{Ci/ml}$).

3.2.1.3.2. Zugabe von ^3H -TdR zum Perfusat

Zu definierten Zeitpunkten nach Perfusionsbeginn (bei Umschaltung auf rezirkulierende Perfusion , nach 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h oder 7 h) wurde ^3H -TdR appliziert. Dazu wurde 1 ml einer Lösung verwendet, die aus 1 ml der vom Hersteller gelieferten Lösung (1 mCi/ml) und 4 ml physiologischer NaCl-Lösung zusammengesetzt war (Endkonzentration 0.2 mCi/ml).

Ein Milliliter dieser Lösung (200 μCi) wurde in einer Tuberkulin-Spritze innerhalb eines Zeitraumes von 4 Minuten dem Perfusat zugegeben. Bei einer mittleren Geschwindigkeit des Perfusatflusses von 32 ml/min war die zugesetzte Aktivität etwa 1.56 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ Perfusat/min. Maximal 2 Minuten nach Zugabe der radioaktiven Lösung war die Gesamtdosis von 0.2 mCi einmal durch das Perfusionssystem zirkuliert. Danach hatte sich eine Konzentration von 3.33×10^{-6} Ci/ml Perfusat eingestellt. Zur Vermeidung von Störungen des Mischungsprozesses während der Radioaktivitätszugabe (z.B. Turbulenz im Sammel- oder im Untersuchungsgefäß) wurde darauf geachtet, daß die Nadel der Tuberkulinspritze während der Applikation innerhalb des Sammelgefäßes in die abführende Bahn des venösen Abflusses eingeführt war.

3.2.1.4. Perfusatwechsel bei mehrstündigen Perfusionen

Zur Vermeidung einer Akkumulation von Stoffwechselendprodukten im Perfusionsmedium erfolgte bei Experimenten von mehr als zweistündiger Dauer ein Austausch des Perfusats. Zu diesem Zweck wurde das Perfusat abgeleitet und gleichzeitig durch neues Medium ersetzt. Danach wurde das System wieder geschlossen, so daß die Rezirkulation wieder hergestellt war.

3.2.1.5. Beendigung des Versuches

Nach Ablauf der Perfusions-Dauer wurde das verbrauchte Medium

durch Krebs-Henseleit-Lösung ersetzt. Das System blieb dabei auf nicht-rezirkulierend geschaltet und wurde mit 300 ml der Elektrolyt-Lösung durchströmt. Dadurch war es möglich, die Konzentration der nicht zur DNA-Synthese verwendeten radioaktiven Vorläufer oder deren Abbauprodukte in den interzellulären Räumen zu senken und damit die Genauigkeit der Radioaktivitätsbestimmung im Präzipitat und der autoradiographischen Auswertung zu erhöhen.

Für die Autoradiographie wurde der proximale Anteil der perfundierten Leberlappen in einer 10%igen Formollösung fixiert, der 0.1 mg inaktives Thymidin pro ml Lösung zum Austausch gegen niedermolekulare Radioaktivität zugesetzt war. Der distale Anteil der Leberlappen wurde für die Radioaktivitätsmessung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Abschließend wurde das Perfusionssystem zur Reinigung mit 300.0 ml 10%iger RBS 50-Lösung durchströmt und mit reichlich destilliertem Wasser (300-500 ml) nachgespült.

3.2.1.6. Autoradiographie

Das in Formol fixierte Lebergewebe wurde in 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten. Nach einem zweiten Fixierungsschritt mit Formollösung (minimale Dauer 24 Stunden) erfolgte Paraffin-Einbettung. Anschließend wurden 4-5 μm dicke Schnitte angefertigt. Die Autoradiographien wurden anfänglich mit der Stripping-Film-Methode (Kodak AR 10), später mit flüssiger Emulsion (Ilford K₂) hergestellt. Die Expositionszeit variierte zwischen 10 und 21 Tage bei 4°C. Danach wurden die Schnitte entwickelt (Amidol, Na₂SO₃, KBr). Die Entwicklungszeit betrug 12 min. Abschließend

wurden die Schnitte fixiert (25-30 min) und mit Hämalaun und Eosin gefärbt.

3.2.1.7. Auswertung der Autoradiogramme

Die Leberlobuli wurden im Mikroskop bei 100facher Vergrößerung eingestellt. Die Zahl der DNA-synthetisierenden Zellen als prozentualer Anteil an der Gesamtzahl ausgezählter Hepatozyten (Markierungsindex : MI) wurde bei 1000facher Vergrößerung bestimmt. Die Zahl der pro Präparat ausgezählten Hepatozytenkerne betrug mindestens 1200.

Unter den Bedingungen der Perfusion wurde eine homogene Durchströmung des gesamten Organs nicht in allen Experimenten erreicht. In diesen Fällen wurde nicht wie üblicherweise der Lobus caudatus, sondern der Leberlappen mit der größten Markierungsdichte ausgewertet.

3.2.1.8. Bestimmung des inkorporierten ^3H -TdR

Die Messung der Radioaktivität im Perchlorsäure-Präzipitat zum Nachweis des inkorporierten ^3H -TdR wurde nach der Methode von Rabes (1967) durchgeführt.

Nach Auftauen des in flüssigem Stickstoff gefrorenen Lebergewebes wurden hiervon 0.125 g abgetrennt. In 2.5 ml eisgekühltem, destillierten Wasser folgte manuelle Homogenisierung mit einem Glashomogenisator. 1 ml des Homogenates wurde mit 0.5 ml 0.6n eisgekühlter Perchlorsäure (HClO_4) gemischt. Nach 2-3 minütigem Zentrifugieren auf 2000 rpm wurde das

erhaltene Präzipitat zweimal mit 1 ml 0.2n HClO_4 gewaschen.

In reiner Sauerstoffatmosphäre wurde das getrocknete (24 Stunden bei 45°C) und gewogene Präzipitat in einem Duran-Glas-Rundkolben (Rabes 1967) verbrannt. Im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Tricarb 3214, Packard Instrument) folgte die Messung der Radioaktivität. Die gewonnenen Ergebnisse wurden auf Zerfälle pro Minute und Milligramm säureunlösliches, getrocknetes Präzipitat umgerechnet (cpm/mg).

In Einzelheiten folgte diese Bestimmung der von Iseler (1977) beschriebenen Methode.

3.2.2. Nachweis der DNA-Synthese der teilresezierten Rattenleber unter den Bedingungen der Perfusion

3.2.2.1. Versuchsanordnung

28 Ratten (188-205 g) wurden partiell hepatektomiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zweidrittel-Hepatektomie (13 h, 14 h, 15 h, 15.5 h, 16 h, 16.5 h, 17 h, 17.5 h, 18 h, 18.5 h, 19 h, 20 h oder 22 h) wurde die Leber isoliert und ins Perfusionssystem übernommen. Dort erfolgte eine 30minütige Perfusion. Nachdem der Perfusionskreislauf nach Einbringen der Leber geschlossen war, wurden die DNA-synthetisierenden Hepatozyten wie unter 3.2.1.3.2. beschrieben markiert. Das Perfusionsmedium bestand aus Krebs-Henseleit-Lösung mit Zusatz von Rinderserum-Albumin in der Endkonzentration von 4 g/100 ml.

3.2.2.2. Ergebnisse

Abb. 2 zeigt, daß in einer 13 oder 14 Stunde nach Teilresektion isolierten und für 30 Minuten perfundierten Leber ein geringer Einbau an Radioaktivität in das Perchlorsäure-Präzipitat besteht. Von der 14. Stunde nach Zweidrittel-Hepatektomie an ist jedoch ein konstanter Anstieg im Kurvenverlauf zu beobachten. Zwischen der 14. und 22. Stunde post operationem ist eine regelmäßige Zunahme des inkorporierten ^3H -TdR des HClO_4 -Präzipitats von etwa 114 cpm/mg/h zu errechnen. Dies entspricht einer Gesamtzunahme um den Faktor 42.

Der Markierungsindex bleibt bis 15.5 Stunden nach Teilresektion nahezu

unverändert. In den folgenden 4.5 Stunden steigt die Kurve steil und annähernd linear von 0.4 % auf 19.1 % markierter Zellen an. Dies stellt eine Erhöhung um etwa 480 % dar. Zwischen der 20. und 22. Stunde nach Zweidrittelhepatektomie stellt sich annähernd ein Plateau ein (Abb. 3).

Die Leberzelle ist unter den Bedingungen der hämoglobinfreien Durchströmung zur Bildung der Desoxyribonukleinsäure befähigt. Der Einbau von radioaktiv-markierten Vorläufern der DNA-Synthese deutet die Intaktheit der komplizierten Syntheseprozesse an.

3.2.2.3. Diskussion

Nach Teilhepatektomie erfordert die Homöostase des Stoffwechselmetabolismus eine dreifach erhöhte Arbeitsleistung der Leberzellen. Neben der Funktionserhöhung wird der Hepatozyt in der Prasynthesephase zusätzlich durch die Prozesse belastet, die der Organrestitution dienen. Offenbar wird in vivo die Breite der funktionellen Leistungen eingeschränkt (Weinbren 1959, Harkness 1957, Morgan und Brackenridge 1962). Vorteilhaft für Studien der Regulationsprozesse ist die Verwendung des Perfusionssystems, da die Leber von Funktionen, die auf die Erhaltung der Homöostase im Organismus ausgerichtet sind, weitgehend freigestellt ist, soweit nicht Äquilibration des Perfusats als physiologisch funktionelle Leistung der Leber gesehen werden muß.

Im Perfusionssystem wird die Zunahme der Zahl DNA-synthetisierender

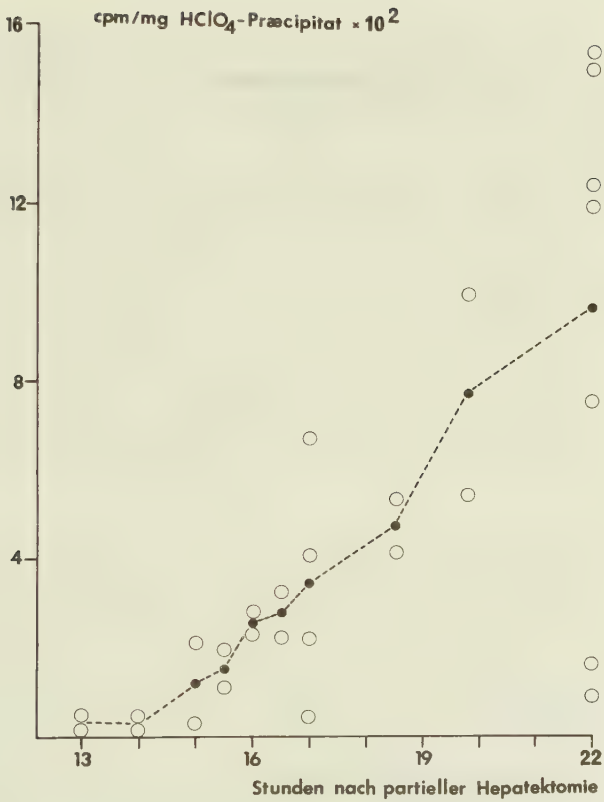


Abb. 2 ^3H -TdR-Inkorporation (cpm/mg säureunlösliches Präcipitat, Ordinate) in die perfundierte Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie (Abszisse) und anschließender Perfusion über einen Zeitraum von 30 min.
(O = Einzelmeßwert je einer Rattenleber, ●---● = Mittelwert)

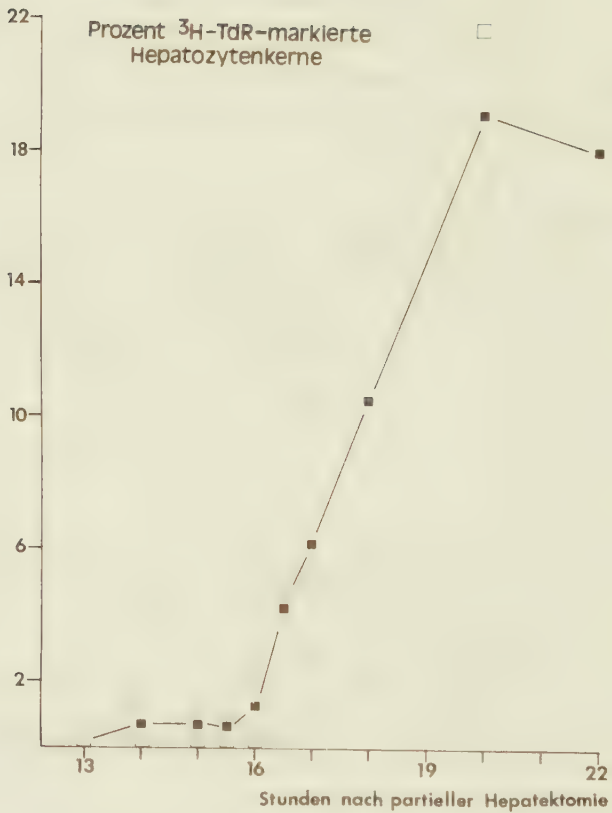


Abb. 3

Markierungsindex der Parenchymzellen in der regenerierenden, für 30 min isoliert perfundierten Rattenleber als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie

(□ = Einzelmeßwert je einer Rattenleber, ■—■ = Mittelw

Zellen von der 15.5 Stunde nach Teilresektion an sichtbar. Diese Befunde entsprechen den Verhältnissen im intakten Organismus (Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968). Demnach ist durch die Entnahme der Leber aus den physiologischen Verhältnissen und die anschließende Durchströmung mit definiertem Perfusionsmedium kein veränderter Beginn der DNA-Synthese zu beobachten. Die Zunahme der ^3H -TdR-Inkorporation im säureunlöslichen Präzipitat ist mit Ergebnissen von Untersuchungen von Gerber (1973) vergleichbar, der einen Anstieg der spezifischen Aktivität der DNA von der 18. Stunde nach Teilhepatektomie an nachweisen konnte. Als Perfusionslösung verwendete Gerber jedoch 30 ml heparinisiertes Blut, 10 ml Ringerlösung und 250 mg Glucose.

Der Einbau markierter Substanzen in vivo kann mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet sein. Diese wurden von Quastler (1963) aufgezeigt. Vom Injektionsort (Speicherung und Abbau), über den Blutweg (Zufluß endogener Vorläufer, Ausscheidung, Abbau und Einbau in rasch proliferierende Gewebe) bis hin zum Eintritt in die Leberzelle (Wirkung zelleigener Vorläufer-Pools) wirken zahlreiche Einflüsse konzentrationsändernd. In den Perfusionsexperimenten bietet sich die Möglichkeit, die Zahl der Fehlerquellen zu vermindern. Demnach ist beim Vergleich zwischen in vivo- und Perfusions-Ergebnissen die Ungleichheit der Zahl der konzentrationsverändernden Faktoren zu berücksichtigen.

Die Markierung der Zellen kann als Ergebnis gezielter Aufnahme von ^3H -TdR und spezifischen Einbaus des radioaktiven Nucleosids in die

DNA gewertet werden. Diese Leistung ist nur an intakten Systemen möglich. Sie erfordert den geordneten Ablauf enzymatischer Reaktionen. Dabei ist es notwendig, das angebotene Thymidin in das Nucleosidtriphosphat umzuformen und die Polymerisierung mit den Adenin, Guanin und Cytosin enthaltenden Nucleotiden zu verwirklichen (Kornberg 1960). Wie die Ergebnisse zeigen, sind diese Bedingungen im Perfusionssystem gegeben und werden unter den gewählten Verhältnissen aufrechterhalten.

Die Präsynthese-Phase zwischen Teilhepatektomie und dem Auftreten der ersten markierten Zellen im Autoradiogramm nimmt im Vergleich zu der G_1 -Phase des physiologischen Ersatzwachstums und den nach dem ersten Teilungsschritt folgenden G_1 -Phasen eine besondere Stellung ein. Im Gegensatz zum physiologischen Proliferationsverhalten tritt nach Zweidrittelhepatektomie eine Geschwindigkeitszunahme der zur Zellteilung notwendigen Prozesse ein. Da nach dem ersten Teilungsschritt die zur DNA-Synthese erforderlichen Enzyme, wie z.B. die Thymidinkinase keinen Abfall zeigen (Bollum und Potter 1959) ist auch die im zweiten Teilungsschritt folgende G_1 -Phase nicht identisch. Es persistieren somit im Perfusionssystem nicht die Stoffwechselprozesse einer beliebigen G_1 -Phase, sondern die Vorgänge der Präsynthese-Phase unter diesen besonderen Bedingungen.

3.2.3. Untersuchungen zum Übertritt der Hepatozyten vom G_1 - in das S-Kompartiment im Perfusionssystem

3.2.3.1. Erörterung des Problems

Autoradiographie, biophysikalische Isolierung und genetische Studien haben gezeigt, daß die Ordnung und der Ablauf der DNA-Replikation in allen Generationen eines Zellstammes erhalten bleiben (Rueckert und Mueller 1960, Stubblefield und Mueller 1962, Johnson und Holland 1965, Preskott 1966, Patt und Quastler 1967, Robbins und Borun 1967, Adegoke und Taylor 1977). Die Klarheit der Ordnung erfordert bestimmte Regulationsmechanismen, welche die Leberzelle befähigen, die vorbereitenden Synthesen zur identischen, semikonservativen DNA-Verdoppelung durchzuführen. Erst nach Abschluß dieser Prozesse tritt der Hepatozyt in die DNA-Synthese-Phase ein.

Als limitierender Faktor von in vitro-Untersuchungen der Proliferation ist der Influx von Zellen nach S anzusehen (Ausnahme : Tumorzellen und embryonales Gewebe). Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt. Im Perfusionssystem wurde untersucht ob unter den dort vorliegenden Bedingungen Zellen aus dem G_1 - in das S-Kompartiment einströmen.

3.2.3.2. Versuchsanordnung

An 65 männlichen Wistarratten (171-202 g) wurde eine Zweidrittel-Resektion durchgeführt (siehe 3.2.1.1.). Die Tiere wurden in vier

Versuchsgruppen eingeteilt (A, B, C, D). In allen Experimenten wurde als Perfusionsmedium Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Die Zugabe von ^3H -TdR erfolgte nach der unter 3.2.1.3.2. beschriebenen Methode jeweils 30 min vor Versuchsende.

Die Lebern der Ratten der Gruppe A wurden zur 15.5 h, 16.5 h, 17 h, 18 h, 18.5 h und 22 h nach Teilresektion aus dem Organismus entnommen (siehe 2.4) und in das Perfusionssystem gebracht. Das Organ wurde danach drei Stunden perfundiert.

Nach dem gleichen Prinzip wurden die Lebern der Ratten von Gruppe B ins Perfusionssystem eingebracht (13 h, 14 h, 15 h, 17 h oder 22 h nach Teilresektion). Diese Lebern wurden 5 Stunden durchströmt.

Zur 17. Stunde (Gruppe C) oder 22. Stunde (Gruppe D) nach Teilhepatektomie wurden die Lebern der Ratten isoliert und in das Perfusionssystem übernommen und während 30 min, 1 h, 3 h, 5 h oder 7 h mit Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung durchströmt.

3.2.3.3. Ergebnisse

3.2.3.3.1. DNA-Synthese nach 3-Stunden-Perfusion in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach partieller Hepatektomie

Proportional dem Zeitpunkt der Organentnahme aus dem Organismus (15.5 h bis 18 h) ergibt sich zunächst ein konstanter Anstieg des inkorporierten

^3H -TdR im säureunlöslichen HClO_4 -Präzipitat. Das Maximum liegt um den Faktor 3 höher als der Ausgangswert 15.5 h nach partieller Hepatektomie. Danach fällt die Kurve mit flachem Schenkel ab (Organentnahme zwischen der 18 h und 22 h nach Teilresektion). Die Abnahme beträgt etwa 7 % des Maximalwertes pro Stunde (Abb.4). Der Vergleich zwischen der 30 minütigen und der 3 stündigen Perfusion zeigt, daß die Vergleichswerte der kurzzeitigen Perfusion nicht erreicht werden (Abb. 5).

3.2.3.3.2. DNA-Synthese nach 5-Stunden-Perfusion in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Organisolierung nach partieller Hepatektomie

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung im HClO_4 -Präzipitat im Vergleich zwischen der 30minütigen und der 5stündigen Perfusion. Gegenüber den bereits gezeigten, erhöhten Werten der 3stündigen Perfusion ergibt sich daraus ein weiterer geringer Anstieg. Zum zusätzlichen Vergleich sind in der letzten Spalte der Tabelle 2 "Sollwerte" eingetragen, die aus der Abb. 2 ermittelt worden sind. "Sollwert" bedeutet dabei den Radioaktivitätsgehalt des HClO_4 -Präzipitates nach 30minütiger Perfusion als Funktion des Markierungszeitpunktes nach Teilresektion. Diese "Sollwerte" werden bei langdauernden Perfusionen in keinem Experiment erreicht.

3.2.3.3.3. DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Dauer der Perfusion der siebzehn oder zweiundzwanzig Stunden nach partieller Hepatektomie untersuchten Leber

Rattenlebern, zur 17. Stunde nach Teilresektion entnommen und mit unterschiedlicher Dauer durchströmt, zeigen im Radioaktivitätsgehalt des

HClO_4 -Präzipitates und im Markierungsindex bezogen auf die Versuchsdauer ein heterogenes Inkorporationsmuster, dessen Tendenz jedoch eine direkte Tendenz zur Dauer der Perfusion andeutet (Tab.3). Die markierten Zellen liegen vornehmlich in der periportalen und zu geringerem Teil in der sog. Intermediärzone.

Nach Isolierung und Durchströmung der Rattenlebern mit unterschiedlicher Dauer von der 22. Stunde nach Zweidrittel-Resektion an reduzieren sich die gemessene Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat und der Markierungsindex annähernd in indirekter Proportion zur Dauer des Versuches. Nach 7 Stunden der Perfusion ist die inkorporierte Radioaktivität um etwa 45 % und der Markierungsindex um 36 % gesunken (Tab.4).

Das Markierungsmuster im Leberläppchen ist durch eine Anhäufung der markierten Zellen in der periportalen und einer geringeren Zahl markierter Zellen in der intermediären Zone gekennzeichnet. In der perivenösen Zone finden sich nur vereinzelt DNA-synthetisierende Zellen.

3.2.3.4. Diskussion

Die Zellproliferation nach Zweidrittel-Resektion entspricht einer 50-100 fachen Erhöhung der physiologischen Zellumsatzrate in der adulten Leber. Der Mechanismus, durch den die Leber den Zellverlust erkennt und mit einer Zellneubildung beantwortet, ist nicht bekannt.

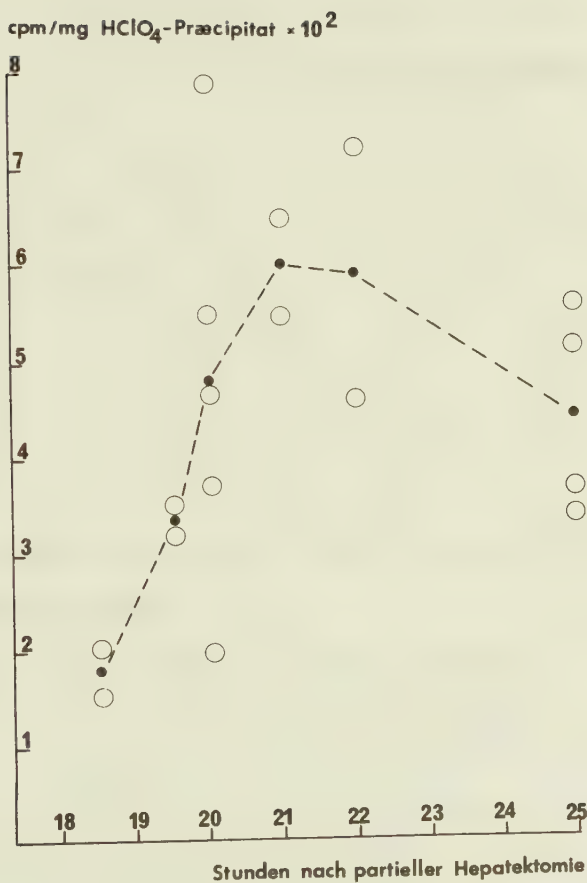


Abb. 4

Inkorporation von ³H-TdR in die säureunlösliche Fraktion der regenerierenden, für 3 h perfundierten Rattenleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. Zugabe von ³H-TdR erfolgte 2.5 h nach Versuchsbeginn
 (○ = Einzelmeßwerte je einer Rattenleber,
 ● --- ● = Mittelwert)

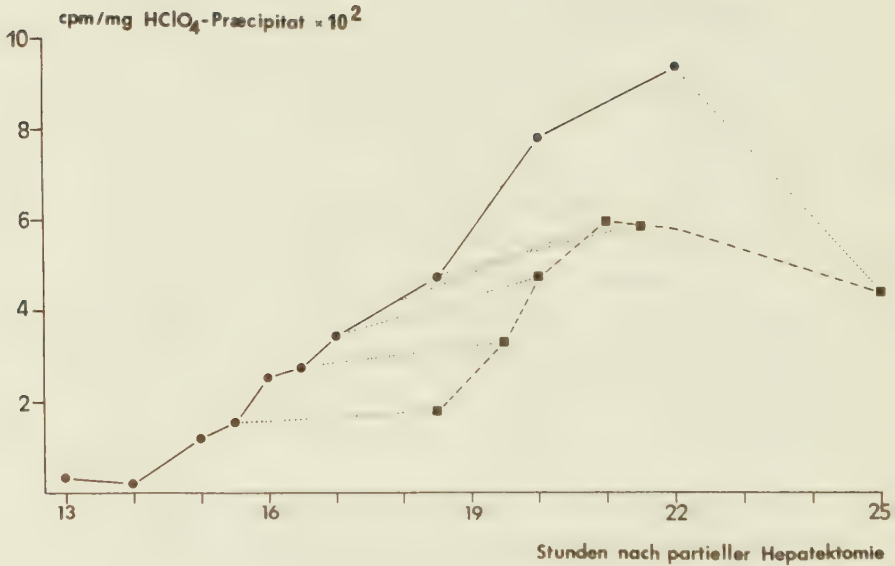


Abb. 5: Radioaktivitätsbestimmung im HClO_4 -Präcipitat im Vergleich zwischen einer 30 min und 3 Std perfundierten, regenerierenden Rattenleber. ^3H -Thymidin-Angebot für 30 min. (●—● = Mittelwerte der 30 min perfundierten Rattenleber, ■---■ = Mittelwerte der 3 h perfundierten Rattenleber, = Vergleich zwischen dem Radioaktivitätsgehalt der 30min und der 3 h Perfusion)

Tabelle 2 : Radioaktivitätsgehalt im HClO_4 -Präcipitat (cpm/mg)
im Vergleich zwischen der 30minütigen und 5stündigen
Perfusion. In Spalte 4 sind die aus Abb. 3 ermittelten
Sollwerte nach 5 stündiger Perfusion eingetragen.

Zeitpunkt nach Hepatektomie (Std)	30-Minuten- Perfusion	5-Stunden- Perfusion	Sollwert der 5-Stunden-Perf.
13. Stunde	32.7	398.4	435.0
14. Stunde	22.2	35.8	690.0
15. Stunde	119.4	104.1	722.3
17. Stunde	345.4	555.0	933.7
22. Stunde	933.7	547.9	—

Tabelle 3 : Markierungsindex und Radioaktivitätsbestimmung im
 HClO_4 -Präcipitat der regenerierenden, von der 17.
Stunde nach Teilhepatektomie an perfundierten
Rattenleber (Mittelwert $\pm$ Mittlerer Fehler)

Perfusionsdauer (Stunden)	Anzahl der Versuche	Radioaktivität im Präcipitat (cpm/mg)	Markierungs- index
0.5	4	345.4 $\pm$ 132.9	6.1 $\pm$ 2.2
1.0	4	273.4 $\pm$ 90.5	8.1 $\pm$ 5.0
3.0	4	474.6 $\pm$ 97.6	15.2 $\pm$ 0.6
5.0	4	555.0 $\pm$ 173.9	11.5 $\pm$ 6.1

Tabelle 4 : Markierungsindex und Radioaktivitätsbestimmung (cpm/mg)
im HClO_4 -Präcipitat der regenerierenden, von der 22. Stunde
nach partieller Hepatektomie an perfundierten Rattenleber
(Mittelwert $\pm$ Mittlerer Fehler)

Perfusions- dauer (Stunden)	Anzahl der Versuche	Radioaktivität im Präcipitat		Markierungs- index	
			% gegen 0.5 h- Perfusionswert		% gegen Perfusions
0.5	7	933.7 $\pm$ 229.7		17.7 $\pm$ 4.6	
1.0	5	808.2 $\pm$ 209.9	-13.4	15.0 $\pm$ 5.1	-15.
2.0	5	756.9 $\pm$ 251.7	-18.9	17.2 $\pm$ 4.8	- 2.
3.0	4	441.5 $\pm$ 53.9	-52.7	15.0 $\pm$ 4.2	-15.
5.0	4	679.3 $\pm$ 239.8	-27.3	10.8 $\pm$ 3.5	-39.
7.0	2	513.4 $\pm$ 134.4	-45.0	11.4 $\pm$ 11.3	-35.

Der adulte Hepatozyt führt in der Zeitspanne zwischen Teilresektion und dem ersten Auftreten DNA-synthetisierender Zellen neben funktionellen Leistungen auch die essentiellen Vorbereitungen für die Proliferation aus. In der G_1 -Phase sind in der Leberzelle Veränderungen zu beobachten. Etwa eine Stunde nach Zweidrittel-Hepatektomie ist das Auftreten einer hochmolekularen Ribonucleinsäure (RNA) nachweisbar, die unter physiologischen Bedingungen nicht gebildet wird (Mayfield und Bonner 1972). Ein weiterer Anstieg der RNA-Synthese konnte in der späten G_1 -Phase gefunden werden (Rabes und Brändle 1969). Von der 12. bis zur 22.5 Stunde tritt eine Erhöhung der Biosynthese von Histonen ein (Butler und Cohn 1963, Prescott 1966). Durch Messung des zyklischen Adenosin-Monophosphats (cyclo-AMP), als Bindeglied zwischen hormonaler Information und zellulärer Reaktion wurden drei Peaks aufgezeigt, deren letzter unmittelbar vor Beginn der DNA-Synthese lag (Thrower und Ord 1974). Der durch die DNA-Synthese erhöhte Bedarf von Thymidin ist mit einem verlangsamten Abbau dieser Substanz gekoppelt (Ferdinandus et al. 1971, Bresnick 1971). Weitere zur DNA-Synthese notwendigen Enzyme zeigen einen Anstieg, wie z.B. die Thymidin-Synthetase (Weissmann et al. 1960) und die DNA-Polymerase (Bollum und Potter 1959). Zur Durchführung der DNA-Synthese benötigt die Leberzelle eine Reihe von Faktoren wie die Vorläufer der Adenin-, Guanin-, Cytosin- und Thymidin-Nucleotid-Synthese, Enzyme, Coenzyme und energiereiche Verbindungen (Bucher 1963).

Im Gegensatz zum vorangehenden Kapitel, in dem die Vergleichbarkeit der Durchführung der DNA-Synthese zwischen perfundierter Leber und den Versuchen in vivo nachgewiesen wurde, sollte mit der vorliegenden Versuchsanordnung der Übertritt der Zellen in die DNA-Synthese unter

Perfusionsbedingungen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl nach 2.5 bzw 4.5 Stunden Perfusion, bevor ^3H -Thymidin für dreißig Minuten angeboten wurde, die Sollwerte im Vergleich zur 30-Minuten-Perfusion nicht erreicht werden. Dies läßt zumindest auf eine Einschränkung im Übertritt von Zellen aus G_1 nach S schließen.

Geht man von einem Nicht-Eintritt von Hepatozyten in die DNA-Synthese-Phase aus, so muß der Anstieg der inkorporierten Radioaktivität als Funktion der Perfusions-Dauer anders gedeutet werden: Als Erklärung des Anstiegs der ^3H -TdR-Inkorporation als Funktion der Perfusions-Dauer ist die unterschiedliche DNA-Synthese-Rate in verschiedenen Abschnitten der DNA-Synthese-Phase zu diskutieren. An Normoblasten (Alpen und Johnston 1967) und fetalen Rattenzellen (Wegener et al. 1964) wurde eine niedrige DNA-Synthese-Rate zu Beginn und am Ende der S -Phase gefunden. HeLa-Zellen zeigen während der ersten fünf Stunden der S -Phase einen etwa linearen Anstieg, mit einer in der Mitte von S mehr als doppelt so hohen DNA-Synthese-Geschwindigkeit als zu Beginn (Painter und Schaefer 1971). Diese Veränderungen der Synthese-Rate sind in der regenerierenden Rattenleber nicht nur am Gesamtorgan, sondern auf der Ebene der einzelnen Hepatozyten, eines Chromosomenstranges und auch im molekularen Bereich zu bestimmen (Looney et al. 1967).

Der nicht rektanguläre, sondern allmähliche Anstieg der Synthese-Geschwindigkeit ist als wesentlicher Faktor des Anstiegs der ^3H -TdR-Inkorporation zu beachten. Als zusätzliche Ursache besteht die Möglichkeit der Reutilisation von radioaktiven Vorläufern der DNA-Synthese.

Durch Reutilisationsprozesse können in der S-Phase befindliche Hepatozyten in zeitlichem Abstand nach Zugabe von ^3H -Thymidin markiert werden (Diderhom et al. 1962, Bryant 1962, 1963, 1965, Fichtelius und Groth 1963, Steel und Lamerton 1965, Stone et al. 1965, Feinendegen et al. 1966). Mehrere Markierungsmechanismen sind dabei unterscheidbar (Steel und Lamerton 1965). Als Quellen der Reutilisation dienen dabei niedermolekulare DNA-Bruchstücke (Bryant 1962) aus abgestorbenen Zellen (Bryant 1963, 1965) und Leukozyten-DNA (Bryant 1962). Die letztgenannte Quelle entfällt unter Perfusionsbedingungen.

Der Anstieg im Markierungsindex der zur 17. Stunde entnommenen und für unterschiedliche Dauer perfundierten Leber erlaubt nicht ohne weiteres die Annahme des Eintritts der Zellen nach S. Zu diesem Zeitpunkt der Entnahme zeigt die Kurve der Markierungsindices und der Radioaktivitätsmessung einen steil ansteigenden Schenkel (Abb. 2 und 3). Kurze Zeitverschiebungen können in diesem Bereich zu starken Veränderungen der Zahl markierter Zellen und der ^3H -TdR-Inkorporation führen. Tierindividuelle Faktoren können hierbei zu erheblichen Unterschieden in den Ergebnissen führen. Diese Tatsache ist zur Erklärung der beträchtlichen Streuung der Ergebnisse in Betracht zu ziehen.

Gegen einen Übertritt von Zellen aus dem G_1 - in das S-Kompartiment sprechen auch die Befunde, die in Tabelle 4 eingetragen sind. Entgegen einem Anstieg bis zu einem ersten Gipfel, der unter in vivo-Bedingungen zur 24. Stunde erreicht ist, wird im Perfusionssystem eine Abnahme der absoluten Werte des Markierungsindex und der ^3H -TdR-Inkorporation beobachtet.

In der unbehandelten, adulten Leber sind die proliferierenden Zellen regellos im Leberläppchen und gleichartig in allen Leberlappen verteilt (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Während der Regeneration nach Teilresektion tritt eine Abhängigkeit der Lokalisation der DNA-synthetisierenden Zellen von ihrer Lage im Acinus ein. Diese Zellen finden sich zuerst überwiegend in der periportal Zone (Harkness 1952, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Edwards und Koch 1964, Rabes und Tuczek 1967, 1970). Nach 20 Stunden sind 80% der markierten Zellen im periportal und etwa 15 % im intermediären Bereich des Leberläppchens lokalisiert (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Eine Sonderstellung nehmen die unmittelbar periportal gelegenen Zellen ein (Rabes und Tuczek 1967, 1970). Diese Zellen treten gleichzeitig mit den am Übergang von der intermediären in die perivenöse Zone gelegenen Hepatozyten in die S-Phase ein. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand nach Hepatektomie verlagert sich das Markierungs-Muster vom periportal zum intermediären Bereich (Grisham 1962, 1969, Rabes und Tuczek 1970).

Diese topischen Veränderungen sind nach den vorliegenden Ergebnissen auch unter Perfusionsbedingungen zu beobachten. In den Autoradiogrammen der zur 22. Stunde isolierten und kurzfristig perfundierten (30 min) Leber befinden sich markierte Hepatozyten vornehmlich in der periportal Zone. Nach 3-5 stündiger Perfusionsdauer treten Zellen, die sich zu einem frühen Zeitpunkt (16. bis 18. Stunde) bereits in der S-Phase befanden, aus diesem Kompartiment aus und nach G_2 ein. Daraus resultiert eine Markierung vornehmlich der intermediären Zone. Zellen im perivenösen Bereich sind nur vereinzelt markiert.

Die Befunde lassen erkennen, daß im Gegensatz zu dem gehemmten Influx der Zellen in die DNA-Synthese-Phase, der Efflux der Hepatozyten nach G_2 offenbar abläuft.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die regenerierende Leber ohne Zusatz von energiereichen Substraten in das Perfusat noch nach 4.5 Stunden in der Lage ist, DNA zu synthetisieren. Die Ergebnisse der Metabolit-Analysen im Perfusat, die später dargestellt werden, zeigen, daß die Leber die Perfusat-Zusammensetzung selbst modifiziert und dadurch eine weitgehend physiologische Äquilibration erreicht.

3.2.4. Untersuchungen zur Beeinflußbarkeit des Übertritts von Hepatozyten aus dem G_1 - in das S-Kompartiment

Die bisher gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Influx von Zellen aus der Präsynthese- in die DNA-Synthese-Phase unter den Bedingungen der Perfusion gehemmt ist. Die Variabilität der Ergebnisse ließen jedoch noch keine endgültige Schlußfolgerung zu.

Zur Einschränkung der Variabilität von tierindividuellen Faktoren wurden Durchströmungs-Versuche zur Bestimmung des G_1 -S-Influx an konsekutiv von derselben Leber gewonnenem Material durchgeführt. Die Zusammensetzung des Perfusionsmediums wurde modifiziert.

3.2.4.1. Material und Methoden

3.2.4.1.1. Tiermaterial, Operation und Bestimmungsmethoden

Tiermaterial (14 männliche Wistarratten im Gewicht von 199-204 g), Zweidrittelresektion, Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen, Autoradiographie und Auswertung sind unter 3.2.1. beschrieben. Auf die Radioaktivitätsbestimmung im HClO_4 -Präzipitat wurde wegen der Verwendung von ^{14}C -Thymidin verzichtet.

3.2.4.1.2 Technik der Perfusion

Die Perfusionen wurden nach der unter 2.4. beschriebenen Methode durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Perfusion der Leber in zwei Versuchen am offenen System, d.h. das Perfusat wurde nicht rezirkuliert. Nur für die Zeitspanne des ^3H -TdR-Angebotes im Perfusat (je 30 min) war das Perfusionssystem auf rezirkulierend eingestellt.

3.2.4.1.3. Perfusionslösungen

3.2.4.1.3.1. Perfusionsmedium mit TCM 199

Das Perfusat bestand aus 4 Teilen des Kulturmediums TCM 199 und 1 Teil der unter 2.5 beschriebenen Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung. Die in einem Liter Perfusionslösung enthaltenen Substanzen und Konzentrationen sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Endkonzentration von Albumin im Perfusat

betrug 1 Prozent. Glucose wurde in der Konzentration von 0.1 g % hinzugegeben. Der pH-Wert war auf 7.6 eingestellt.

Kurz vor Versuchsbeginn wurden 5 mg Nicotinsäure, 1.0 g Glucose und 100 μ Einheiten Insulin (Altinsulin Hoechst) in 10.0 ml Krebs-Henseleit-Lösung angesetzt. Zu Versuchsbeginn und dann in stündlichen Abständen wurden je 2 ml dieser Lösung mit einer Tuberkulinspritze dem Perfusat im Sammelgefäß zugegeben.

3.2.4.1.3.2. Perfusionsmedium mit Ham F-10

9.84 g pulverisiertes Ham F-10 wurde in 600 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann wurde 4.766 g HEPES und 2 g Glucose zugegeben und mit destilliertem Wasser ad 1.0 Liter aufgefüllt. Nach Einstellen des pH auf 7.2 diente diese Lösung in zwei Versuchen als Perfusat. In einer weiteren Versuchsreihe (4 Experimente) erfolgte die Perfusion mit 4 Teilen dieser Lösung und 1 Teil der unter 2.5. beschriebenen Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung. Die in dem Perfusat enthaltenen Substanzen und Konzentrationen sind in Tabelle 6 eingetragen.

3.2.4.1.3.3. Krebs-Henseleit-Glucose-Insulin-Perfusat

Zu zwölf Liter Elektrolytlösung (Krebs-Henseleit, siehe auch 2.5.) waren Glucose (Endkonzentration 0.1 g %) und Insulin (Gesamtmenge 200 μ Einheiten) zugegeben und dienten in zwei Versuchen im offenen System als Perfusions-Lösung.

3.2.4.1.4. Kontinuierliche Zugabe von Insulin ins Perfusat

Insulin (Altinsulin Hoechst) , gelöst in dem in Tabelle 6 dargestellten Ham F-10-Perfusat , wurde in vier Experimenten mit einem Perfusor mit einer Dosis von 60 mE/h kontinuierlich in der Geschwindigkeit von 3.3 ml/h dem Perfusat (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) zugesetzt. In dem Perfusor war eine Perfusionspritze (20.0 ml) eingespannt und mit dem Perfusionsystem durch eine Perfusor-Infusionsleitung verbunden. Im proximalen Teil der Pfortader-Kanüle (siehe 2.4.) waren die Infusionsleitungen dem Perfusionskreislauf angeschlossen.

3.2.4.2. Versuchsanordnung

14 Ratten (199-204 g) wurden zwischen 14⁰⁰ und 21⁰⁰ teilreseziert. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, Gruppe A : sechs Tiere, Gruppe B und C je 4 Tiere.

3.2.4.2.1. Durchströmung mit Perfusat unterschiedlicher Zusammensetzung

Den Ratten von Gruppe A wurden 15.5 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie 0.1 $\mu\text{Ci/g KG}$ ^{14}C -Thymidin (siehe 3.2.1.3.) intraperitoneal injiziert. Von der 16. Stunde nach Teilresektion ab wurden die Lebern ins Perfusions-system übernommen und 1.5 Stunden durchströmt. Dann erfolgte Zugabe von 100 μCi ^3H -TdR, wie unter 3.2.1.3. beschrieben. Nach 30 Minuten wurde die Radioaktivität aus dem Perfusionsystem durch 5minütige Durchströmung mit Krebs-Henseleit-Lösung entfernt. Dannach erfolgte Abbindung und Formol-

fixierung des ventralen Teils des Processus papillaris. Die Perfusion des restlichen Lebergewebes wurde weitere 2.5 Stunden fortgesetzt, bevor wiederum $100 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$ zugegeben wurde. Nach 30 minütigem Angebot von $^3\text{H-Thymidin}$ folgte 5minütiges Auswaschen der Radioaktivität mit Krebs-Henseleit-Lösung. Entnahme der Leber aus dem Perfusionssystem und Fixierung in Formol. Mit dieser Methode wurden je 2 der 6 Lebern mit demselben Perfusionsmedium durchströmt. Dabei fanden die Ham F-10-Lösung (siehe 3.2.4.1.3.2.), die TCM-199-Lösung (siehe Tabelle 5) und die Krebs-Henseleit-Glucose-Insulin-Lösung (siehe 3.2.4.1.3.3.) als Perfusat Verwendung. Wie erwähnt (3.2.4.1.2. und 3.2.4.1.3.3.), wurde mit der Elektrolyt-Glucose-Insulin-Lösung am offenen System perfundiert und nur während der Zeitspanne des $^3\text{H-Thymidin}$ -Angebotes im Perfusat das System auf rezirkulierend umgeschaltet.

3.2.4.2.2. Perfusionen mit kontinuierlicher Zugabe von Insulin ins Perfusat

Die Experimente mit den Lebern der Ratten von Gruppe B und C wurden zeitlich einheitlich durchgeführt. Die Lebern wurden zur 16. Stunde nach Teilresektion entnommen und die Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen wurde nach 30 minütiger Durchströmung, wie unter 3.2.1.3. beschrieben, vorgenommen. Die Radioaktivität wurde durch 5 minütige Durchströmung mit Krebs-Henseleit-Lösung aus dem Perfusionssystem entfernt. Nach weiteren 2.5 Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt und die Lebern nach 30 Minuten aus dem Perfusionssystem genommen und fixiert. Die Lebern beider Gruppen (B und C) wurden mit dem in Tabelle 6 dargestellten Perfusat durchströmt.

Während der Perfusion der Leber in Gruppe B wurde Insulin mit der Dosis 60 mE/h kontinuierlich durch eine Perfusor zugegeben (siehe 3.2.4.1.4.).

Tabelle 5 : Perfusionsmedium mit TCM 199 (Mengen pro Liter)

L-Arginin	56 mg	Calcium-Pantothenat	0.008 mg
L-Histidin	16 mg	Biotin	0.008 mg
L-Lysin	56 mg	Folsäure	0.008 mg
L-Tyrosin	32 mg	Cholin	0.4 mg
DL-Tryptophan	16 mg	Inositol	0.04 mg
DL-Phenylalanin	40 mg	p-Aminobenzoessäure	0.04 mg
L-Cystin	16 mg	Vitamin A	0.08 mg
DL-Methionin	24 mg	Calciferol	0.08 mg
DL-Serin	40 mg	Menadion	0.008 mg
DL-Threonin	48 mg	-Tocopherol-Phosphat	0.008 mg
DL-Leucin	96 mg	Ascorbinsäure	0.04 mg
DL-Isoleucin	32 mg	Glutathion	0.04 mg
DL-Valin	40 mg	Cholesterol	0.16 mg
DL-Glutaminsäure	120 mg	L-Glutamin	80.0 mg
Asparaginsäure	60 mg	Adenosintriphosphat	0.8 mg
DL-Alanin	40 mg	Adenylsäure	0.16 mg
L-Prolin	32 mg	Ribose	0.4 mg
L-Hydroxyprolin	8 mg	Desoxyribose	0.4 mg
Glycin	40 mg	Bacto-Dextrose	0.8 g
L-Cystein	0.08 mg	Tween 80	4 mg
Adenin	8 mg	Natriumacetat	50 mg
Guanin	0.24 mg	Ferrum	0.08 mg
Xanthin	0.24 mg	NaCl	7.744 g
Hypoxanthin	0.24 mg	KCl	0.408 g
Thymin	0.24 mg	CaCl ₂	0.186 g
Uracil	0.24 mg	Magnesiumsulfat	0.16 g
Thiaminhydrochlorid	0.008 mg	Na ₂ HPO ₄	0.048 g
Riboflavin	0.008 mg	Na ₂ H ₂ PO ₄ × H ₂ O	0.03 g
Pyridoxinhydrochlorid		KH ₂ PO ₄	0.048 g
	0.02 mg	Niacin	0.02 mg
Pyridoxalhydrochlorid		NaHCO ₃	0.7 g
	0.02 mg	Niacinamid	0.02 mg
Na ₂ SO ₄	0.03 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0.048 g
Bactophenolrot	0.016 g		

Tabelle 6 : Perfusionsmedium mit Ham F - 10 (Mengen pro Liter)

CaCl ₂	74 mg	NaCl	7.264 g
KCl	373 mg	Na ₂ HPO ₄	123.2 mg
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	30 mg	KH ₂ PO ₄	66.4 mg
CaCl ₂ × H ₂ O	35.2 mg	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	122.4 mg
NaHCO ₃	1.38 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	48 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	667.2 µg	CuSO ₄ × 6 H ₂ O	1.992 µg
ZnSO ₄ × 2 H ₂ O	23.04 µg	L-Alanin	7.2 mg
L-Arginin × HCl	168.8 mg	L-Asparagin	10.40 mg
L-Asparaginsäure	10.4 mg	L-Cystein	20.0 mg
L-Glutamin	116.8 mg	L-Glutaminsäure	11.76 mg
Glycin	6.008 mg	L-Histidin × HCl xH ₂ O	
L-Isoleucin	2.08 mg		16.8 mg
L-Leucin	10.40 mg	L-Lysin × HCl	23.2 mg
L-Methionin	3.584 mg	L-Phenylalanin	4.0 mg
L-Prolin	9.02 mg	L-Serin	8.4 mg
L-Threonin	2.856 mg	L-Tryptophan	0.48 mg
L-Tyrosin	1.448 mg	L-Valin	2.8 mg
D-Glucose	880 mg	Na-Pyruvat	88 mg
Phenolrot	0.96 mg	Biotin	19.2 µg
D-Ca-Pantothenat	0.572 mg	Cholinchlorid	558.4 µg
Folsäure	1.056 mg	i-Inosit	432.8 µg
Nicotinamid	0.492 mg	Pyridoxin × HCl	0.168 mg
Riboflavin	300.8 µg	Thiamin × HCl	0.8 mg
Vitamin B ₁₂	1.088 mg	Hypoxanthin	3.28 mg
Thymidin	0.584 mg	Liponsäure	0.16 mg

In den Versuchen mit Leber von Tiergruppe C wurde auf Zufuhr von Insulin ins Perfusat verzichtet. Sie dienten als Kontrollgruppe zu den Versuchen der Gruppe B, in denen ein durch Insulin herbeigeführter Effekt auf den G_1 -S-Übertritt von Hepatozyten bestimmt werden sollte.

3.2.4.3. Ergebnisse

3.2.4.3.1. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts der Hepatozyten regenerierender Leber durch modifizierte Perfusionsmedien

Durch Verwendung der TCM 199 - Lösung (siehe Tabelle 5) gelang es, in einem der beiden durchgeführten Versuche einen geringgradigen Anstieg des Markierungsindex zu erzielen (Tab. 7). Die "Sollwerte" der 30minütigen Perfusion werden nach 5stündiger Perfusion jedoch nur zu einem Viertel erreicht.

Auf Grund der durchgeführten Doppelmarkierung (^3H -Thymidin und ^{14}C -Thymidin) war es möglich, biologische Schwankungen von Tier zu Tier auszu-schalten. In den Autoradiogrammen kommen ausschließlich ^3H -Thymidin-markierte Hepatozyten nicht vor. Spurbahnen der energiereicheren ^{14}C - β -Strahlung finden sich in der Emulsionsschicht über allen markierten Zellen. Offensichtlich treten demnach Hepatozyten auch während Durchströmung mit hochwertigen Medien nicht in die S-Phase ein. Die in der DNA-Synthese-Phase befindlichen Zellen setzen ihre DNA-Synthese jedoch fort.

Ein nahezu identisches Ergebnis wurde bei Perfusionen mit der unter 3.2.4.1.3.2. beschriebenen, unverdünnten Ham F-10-Lösung gefunden. Einer Abnahme des Markierungsindex im ersten Versuch (von 0.8 auf 0.4%) steht im zweiten

Versuch ein Anstieg im geringen Maß von 2.1 auf 3.7 % gegenüber(Tab.7)
Auch in diesen Autoradiogrammen sind keine ausschließlich ^3H -Thymidin-
markierten Zellen zu finden.

3.2.4.3.2. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts durch Perfusion am offenen System

Die Markierungsindices der Untersuchungen am offenen System (nicht re-
zirkulierendes Perfusat) lassen keine deutlichen Unterschiede zu Experimenten
am rezirkulierenden System erkennen (geringgradiger Anstieg des Markierungs-
index von 0.1 % auf 3.4 % bzw. von 4.5 % auf 6.2 %) (Tab. 7). Die Ver-
gleichswerte (Abb.3) werden bei weitetem nicht erreicht. In der Emulsions-
schicht über den markierten Zellen sind in den Autoradiogrammen regelmäßig
 ^{14}C -Bahnpuren nachweisbar.

3.2.4.3.3. Beeinflussung des G_1 -S-Übertritts durch kontinuierliche Zufuhr von Insulin ins Perfusat

Bei Gegenüberstellung der Markierungsindices von Lebern, die mit kontinuier-
lichem Zusatz von Insulin zum Perfusat (Gruppe B) perfundiert wurden und
den Kontrollebern (Gruppe C) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede
(Tab. 8). In drei Experimenten ist nach 4 stündiger Perfusion ein Markierungs-
index erzielt, der den "Sollwerten" annähernd entspricht. Den dabei erzielten
Endwerten liegt aber ein relativ hoher Ausgangswert nach einstündiger Perfusion
zugrunde.

Tabelle 7 : Markierungsindices der Durchströmungsversuche mit unterschiedlichen Medien als Perfusionslösung. Darstellung der Einzelwerte.

15.5 h nach Teilhep. : 0.1 $\mu\text{Ci/g KG}$ $^{14}\text{C-TdR}$ (i.p.)

16.0 h nach Teilhep. : Übernahme der Leber ins Perfusionssystem und Durchströmung für 1.5 h

17.5 h nach Teilhep. : 100 μCi $^3\text{H-TdR}$ ins Perfusat (60 ml)

18.0 h nach Teilhep. : Entfernung des ventralen Processus papillaris und Perfusion des Restorgans für 2.5 h

20.5 h nach Teilhep. : 100 μCi $^3\text{H-TdR}$ ins Perfusat (60 ml) für 30 min

Perfusions- lösung	Markierungsindex zur 18. Std nach Teilhep.	Markierungsindex zur 21. Std nach Teilhep.	%-Abweichung gegen MI 18 h nach Teilhep.
1. Perfusat mit TCM 199	0.1 0.4	0.1 4.8	+ 0 + 1100
2. Perfusat mit Ham F-10	2.1 0.8	3.7 0.4	+ 76 - 50
3. Perfusion am offenen System mit 12 l KH und 0.1 g % Glucose	0.1 4.5	3.4 6.2	+ 3300 + 38

Tabelle 8 : Effekt einer kontinuierlichen Zufuhr von Insulin zum mit Ham F-10 angereicherten Perfusat auf den G_1 -S-Übertritt von Hepatozyten

16.0 h nach Teilhep. : Übernahme der Leber ins Perfusionsystem und Perfusion für 30 min
 16.5 h nach Teilhep. : 200 μ Ci 3 H-TdR in das Perfusat (60 ml) für 30 min, Entfernung der Radioaktivität und Perfusion der Leber für 2.5 h
 19.5 h nach Teilhep. : 200 μ Ci 3 H-TdR in das Perfusat (60 ml)
 Sollwert zur 20. Stunde nach Teilhepatektomie : 19.1 %

Perfusions- lösung	Versuchs- Nr.	Markierungsindex 17 h nach Teilhep.	Markierungsindex 22 h nach Teilhep.	%-Abweichung des MI 17 h gegen MI 22 h (20 h)	% gegen Sollwert
Ham F-10 mit Insulin (Gruppe B)	1	0.2	1.8	+ 800	-91
	2	13.6	18.6	+ 37	- 3
	3	14.3	16.9	+ 18	- 15
	4	6.0	5.0	- 17	- 74

Ham F -10 ohne Insulin (Gruppe C)	1	0.1	0.1	+ 0	- 99
	2	4.1	2.7	- 34	- 86
	3	0.2	2.0	+ 1000	- 90
	4	12.2	15.4	+ 26	- 19

3.2.4.4. Diskussion

Zahlreiche Studien über den Wirkungsmechanismus der Initiation der DNA-Synthese nach partieller Hepatektomie haben zu unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen geführt.

Eine humorale Beeinflussung deutet sich aus verschiedenen Untersuchungen an (Wrba et al. 1962, Sigel et al. 1963, Bucher 1963, Leong et al. 1964, Moolten und Bucher 1967, Sakai 1970, Fisher et al. 1971, Thrower und Ord 1974, LaBreque und Pesch 1975, Leffert et al. 1975, Bucher und Swaffield 1975, Richmond und Friedman 1976). Grundsätzlich lassen sich drei Arten von humoraler Kontrolle unterscheiden:

- (1) Auftreten eines Mitose-stimulierenden Faktors als Antwort auf eine partielle Hepatektomie (Moolten und Bucher 1967, Sakai 1970)
- (2) Verminderung eines im Blutplasma zirkulierenden Inhibitors (Grisham 1966, Becker 1970)
- (3) Stimulation als Ungleichgewicht zwischen Normal-Blut-Komponenten und Hepatozytenzahl (Fisher et al. 1971)

Die Entfernung von endokrinen Drüsen blockiert den Prozeß der Initiierung nicht (Becker 1972). Die Unübersichtlichkeit der Regulationsmechanismen wird durch die Tatsache erhöht, daß mehrere Hormon-Systeme an den Regenerations-Vorgängen beteiligt sind: das endokrine Pankreasgewebe (Short et al. 1972, Price et al. 1972, Starzl et al. 1973, Leffert 1974, Bucher und Swaffield 1975), die Nebenschilddrüsen- und Schilddrüsen-hormone (Canzanelli et al. 1949, Rixon und Whitfield 1972) und Hypophysen-hormone (Weinbre 1959, Hemingway und Cater 1958, Morley et al. 1975),

sowie die Nebennierenrinden-Hormone (Feigelson 1962, Leffert 1974).

Short et al. gelang es 1972, einen Anstieg des ^3H -TdR-Markierungsindex ohne Entfernung von Lebergewebe durch Dauerinfusion einer Hormon-Aminosäure-Lösung (in 9 ml 0.15 M NaCl : 100 μg Trijodthyronin, 150 mg Glycin und L-Aminosäuren, 1 mg Glucagon, 100 USP-Einheiten Heparin) zu erzielen.

Besonders ausführlich wurden die Effekte von Insulin untersucht (Starzl et al. 1971, Orloff et al. 1974, Price et al. 1972). Die stimulierende Wirkung von Insulin auf das Wachstum ist nicht an spezifische Zelltypen gebunden (Turkington 1968).

Ein stimulierender Effekt von Insulin auf den G_1 -S-Übertritt von regenerierenden Hepatozyten war im Perfusions-Experiment nicht nachweisbar (Tab.8). Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, daß die wachstumsfördernde Wirkung des Insulins besonders im Zusammenwirken mit zusätzlichen Hormonen (Glucagon und epidermale Wachstumshormon) erfaßt werden kann (Bucher und Swannfield 1975, Richmond et al. 1976). Durch Infusion von Insulin und Glucagon in einer Elektrolyt- und Aminosäure-Lösung (Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Valin, Alanin, Arginin, Histidin, Prolin, Serin, Glycin und Cystein) wurden in eviscerierten Tieren ein Anstieg in der DNA-Synthese erzielt (Bucher und Swaffield 1975). Dabei ist nach partieller Hepatektomie die Membranbindungs-kapazität der Leber für Insulin und Glucagon unterschiedlich (Leffert et al. 1975). Die im Perfusionsexperiment gegenüber den beschriebenen Versuchen veränderten Bindungsverhältnisse der Hormonrezeptoren sind als Ursache des Nicht-Übertritts von regenerierenden Hepatozyten von G_1 nach S zu diskutieren.

Grob gesehen wird durch Insulin der Leberstoffwechsel von Glucosebildung auf Glucoseabbau umgeschaltet. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß Insulin in der Leber als Enzyminduktor wirkt (Weber et al. 1965, Weber 1967). So lassen sich nach vier bis vierundzwanzig Stunden Veränderungen im glykolytischen Enzymmuster der Leberparenchymzellen feststellen. Insulin greift dabei in die Konzentration eines Schlüsselenzyms der Glykolyse (Glucokinase) ändernd ein (Förster und Mehnert 1973). Durch Konzentrationsänderungen der Schlüsselenzyme der Glykolyse läßt sich nicht nur die Gesamtreaktion steuern, sondern zusätzlich lassen sich auch energieverbrauchende Nebenreaktionen vermeiden (Förster und Mehnert 1973). Diese Wirkungen des Insulins mit möglicher Beeinflussung des Influx von Zellen nach S konnten im Perfusions-Experiment wegen der begrenzten Versuchszeit nicht erfaßt werden.

Als entscheidender Faktor in der Regulation von Stoffwechselvorgängen in epithelialen Zellen wurde von Loewenstein und Penn (1967) die interzelluläre Kommunikation angenommen. Für eine solche Möglichkeit ergibt sich nach den vorliegenden Perfusions-Experimenten, in denen die Einheit der Organarchitektur bewahrt ist, kein Anhalt.

Obwohl der Leber in den Perfusionslösungen hochwertige Substrate angeboten wurden, vermag die Leberzelle offenbar nicht in die DNA-Synthese-Phase einzutreten. Substanzen, die für den Übertritt notwendig sind, stehen unter den gewählten Bedingungen offenbar nicht zur Verfügung. Der Nicht-Übertritt in die S-Phase trotz geringgradigen Anstiegs des Markierungsindex scheint durch die Versuche, in denen eine Doppelmarkierung durchgeführt wurde, bewiesen. Hierzu ist einschränkend auf Befunde zu verweisen, die im Abschnitt über Radioaktivität im Perfusat dargestellt werden (siehe 4.4.4.), in denen sich

eine unvollständige Auswaschung des ^{14}C -TdR aus der Leber, vor Übernahme der Leber ins Perfusionssystem, andeutet. Dadurch scheint die Möglichkeit einer Markierung mit ^{14}C -TdR während der Zeitspanne gegeben zu sein, in der im Perfusionssystem der Übertritt von Zellen nach S durch Applikation von ^3H -TdR untersucht wird. Ebenso darf die Frage nach dem Influx von regenerierenden Hepatozyten in die DNA-Synthese-Phase nicht endgültig beantwortet werden, bis Untersuchungen vorliegen, die über die Verwendung des Processus papillaris als adäquaten Kontrollwert für entsprechende Experimente entscheiden.

Die Zunahme der Zahl von DNA-synthetisierenden Zellen während der Perfusion ist zum Teil durch den nicht rektulären Verlauf der DNA-Synthese-Rate erklärbar (Painter und Schaefer 1971). Der Befund einer verzögerten Markierung von Hepatozyten, die bereits in die DNA-Synthese-Phase eingetreten sind, in Verbindung mit den Ergebnissen der Doppelmarkierungs-Versuche deutet an, daß die Replikations-Loci des DNA-Stranges bereits zu frühen Zeitpunkten initiiert sind und schon nach einstündiger Perfusion vorliegen. Die Kopplungsprozesse möglicherweise der DNA-Ligasen könnten demgegenüber verzögert sein. Eine wesentliche Rolle spielt am Beginn der DNA-Synthese die Größe der Desoxyribonucleosid-Triphosphat-Pools. Die Arbeitsgruppen von Walters (1973) und von Skoog (1973) konnten zeigen, daß diese Pools während der G_1 -Phase sehr niedrig sind und sich erst zu Beginn der S-Phase vergrößern. Die hier vorgelegten Befunde deuten an, daß im Perfusionsexperiment Veränderungen der Desoxyribonucleosid-Triphosphat-Pools zumindest zu Beginn eintreten könnten und damit die Interpretation der Ergebnisse über den G_1 -S-Übertritt von Hepatozyten in vitro erschweren.

4. Radioaktivität im Perfusat

4.1. Veränderungen der Radioaktivität im Perfusat

Die zeitliche Verfügbarkeit von ^3H -TdR in vivo für den Einbau in die DNA ist begrenzt (Rubini et al. 1960, Chang und Looney 1965). Die Substanz wird in der Leber abgebaut und durch die Niere ausgeschieden.

In der vorliegenden Versuchsreihe galt es, die qualitativen und quantitativen Veränderungen des zugesetzten ^3H -TdR im Perfusat während der Durchströmungs-Experimente zu bestimmen.

4.2. Methodik

4.2.1. Tiermaterial, Operation und Bestimmungsmethoden

Tiermaterial, Zweidrittel-Hepatektomie, Applikation der radioaktiven Verbindungen, Bestimmungs-Methoden und Auswertung wurden unter 3.2.1. beschrieben. Die Entnahme der Leber und die anschließende Durchströmung entsprach der unter 2.4. beschriebenen Methode.

Ausnahme hiervon bildeten die Versuche zur Bestimmung der Kinetik der Radioaktivitätsfreisetzung während offener Perfusion der vormarkierten Leber. Dabei wurden die regenerierenden Lebern nach Kanülierung der Pfortader und der Hohlvene n i c h t ins Perfusionssystem übernommen, sondern das aus

der Hohlvenen-Kanüle fließende Perfusat wurde in Erlenmeyer-Kolben aufgefangen. In einem Erlenmeyer-Kolben war das Perfusat-Volumen in Abhängigkeit von der jeweiligen Durchflußrate von 2, 3 oder 4 Minuten enthalten.

4.2.2. Probenahme für die Radioaktivitätsbestimmung

Aus dem Sammelgefäß des Perfusionssystems wurde mit einer auf 0.2 ml geeichten Eppendorf-Pipette eine Probe in definierten Abständen (6, 16, 26 min) nach Beendigung der Zugabe der Radioaktivität ins Perfusat entnommen.

Bei der Bestimmung der Kinetik der Radioaktivitätsfreisetzung aus der vormarkierten, regenerierenden Leber während offener Perfusion wurden die Proben (je 0.1 ml) mit der Eppendorf-Pipette aus den Erlenmeyer-Kolben (siehe 4.2.1.) aufgenommen.

In den Versuchen zur Kontrolle der Abgabe radioaktiver Verbindungen aus der Leber während der Perfusion ins Perfusat (siehe Versuchsanordnung 4.3.) wurden die Proben aus dem Perfusat in definierten Abständen (nach 2 min und dann in 15minütigen Abständen) gewonnen (je 0.2 ml).

Die erhaltenen Proben wurden jeweils in einem Scintillatorglas im fünf-fachen Volumen Hyamin aufgenommen. Dazu wurden 10.0 ml Scintillator nach Bray (60 g Naphtalin, 4 g PPO-Packard, 0.2 g POPOP-Packard, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylalkohol, Dioxan ad 1000 ml) pipettiert. Die Aktivität wurde im Scintillationszähler gemessen. Die Ergebnisse sind als Zerfälle pro Minute und Milliliter Perfusat angegeben (cpm/ml).

4.3. Versuchsanordnung

Um Veränderungen der Gesamtradioaktivität nach Zugabe von ^3H -TdR zum Perfusat zu bestimmen, wurden $200\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -Thymidin dem Perfusat (etwa 60 ml), nach definierten Zeitspannen in der unter 3.2.1. beschriebenen Methode, zugesetzt. 6, 16 und 26 Minuten nach Zugabe der Radioaktivität wurden aus dem Sammelgefäß Proben entnommen und die Aktivität bestimmt (siehe 4.2.2.). Die Proben wurden aus 38 Versuchen gewonnen.

Zur Untersuchung der Verfügbarkeit von Radioaktivität zur DNA-Markierung regenerierender Leber im Perfusat 30 Minuten nach Zusatz von ^3H -TdR wurden zwei Rattenlebern zur 20. Stunde nach Teilresektion entnommen und mit der unter 2.5. beschriebenen Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung unter Zusatz von ^3H -TdR perfundiert (30 min). Das Perfusat wurde nach 30 Minuten aufgefangen und weitere regenerierende Rattenlebern 20 Stunden nach Zweidrittel-Resektion mit diesem konditionierten Perfusionsmedium für 30 min durchströmt. Die Bestimmung des Markierungsindex und des Radioaktivitätsgehaltes im HClO_4 -Präzipitat erfolgte wie unter 3.2.1. beschrieben.

In drei Perfusionsexperimenten wurde die Kinetik der Radioaktivitätsfreisetzung aus der vormarkierten regenerierenden Leber während offener Perfusion bestimmt. 3 männliche Wistarratten (AF/Han) im Gewicht von 194-200 g wurden zur 14. oder 20. Stunde nach Teilresektion mit $0.8\ \mu\text{Ci/g KG}\ ^3\text{H}$ -Thymidin (i.p.) vormarkiert. In der üblichen Methode wurden die Lebern nach 30 Minuten für die Perfusion isoliert. Nachdem die Pfortader und die Hohlvene kanüliert waren, erfolgte keine Fixierung im Perfusionssystem, sondern das durch die Pfortaderkanüle in die Leber

strömende Perfusat (Krebs-Henseleit-Lösung) wurde beim Ausfluß durch die Hohlvenen-Kanüle in Erlenmeyer-Kolben fraktioniert in Abständen von 3 - 4 Minuten für insgesamt 21 min abgeleitet. Proben wurden aus den Erlenmeyer-Kolben entnommen und die Radioaktivität bestimmt, wie in 4.2.2. beschrieben.

Zur Messung der Radioaktivitätsabgabe von der Leber in das Perfusat im geschlossenen System wurden 5 Ratten, 184 - 197 g schwer, zur 14. oder 20. Stunde nach Teil-Hepatektomie mit $0.1 \mu\text{Ci/g KG } ^{14}\text{C}$ -Thymidin oder mit $0.8 \mu\text{Ci/g KG } ^3\text{H-TdR}$ in vivo vormarkiert. Nach 30 Minuten wurden die Tiere narkotisiert und die Lebern isoliert. Die Organe wurden nach der im vorgehenden Absatz beschriebenen Methode während 8, 10, 15 oder 18 Minuten mit der Elektrolyt-Lösung ausgespült und das ausfließende Perfusat fraktioniert aufgefangen. Danach erfolgte Übernahme der Leber ins Perfusionsystem. Nach zwei Minuten und dann in 15minütigen Abständen wurden aus dem Perfusat Proben entnommen (0.2 ml) und deren radioaktiver Gehalt gemessen (siehe 4.2.2.).

4.4. Ergebnisse

4.4.1. Veränderungen der Gesamtradioaktivität im Perfusat (60 ml) während 30 min nach Zugabe von $200 \mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$

Die Gesamtradioaktivität nimmt in der gemessenen Zeitspanne nach Radioaktivitätszugabe (10, 20, 30 min) nur wenig ab. Die Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute pro Minute und ml Perfusat vermindert sich zwischen dem 10- und 20-Minuten-Meßwert um 16 % und zwischen dem 20- und 30-

Minuten-Meßwert um weitere 1.9 %. Daraus lassen sich zwei Kinetiken berechnen. Von der 10. bis 20. Minute fällt die Konzentration der Radioaktivität im Perfusat mit einer Geschwindigkeit von 1162 cpm/ml/min ab, hingegen zwischen der 20. und 30. Minute nur noch um 134 Counts pro ml/min. Der Vergleich zwischen dem 10- und 30-Minuten-Meßwert zeigt, daß etwa vier Fünftel des Ausgangswertes erhalten bleiben (Tab. 9).

4.4.2. Verfügbarkeit von ^3H -TdR für den Einbau in die DNA nach 30minütiger Perfusion

In Tabelle 10 sind die Markierungsindices und der Radioaktivitätsgehalt im HClO_4 -Präzipitat der Versuche mit frischem Albumin-Elektrolyt-Medium (Zusatz von 200 μCi ^3H -TdR in 60 ml Perfusat) und den Versuchen mit Wiederverwendung dieses Perfusats in einem anschließenden Experiment eingetragen. Daraus ist ersichtlich, daß in einem Perfusionsexperiment bei Verwendung eines Perfusats, mit dem eine Leber zuvor perfundiert worden war (30 min), kein Einbau in die DNA nachweisbar ist. ^3H -Thymidin steht demnach 30 Minuten nach Zugabe zum Perfusat nicht mehr in der Form zur Verfügung, die für den Einbau in die Desoxyribonukleinsäure erforderlich ist.

4.4.3. Kinetik der Radioaktivitätsfreisetzung aus der vormarkierten, regenerierenden Leber während offener Perfusion

Bei Spülung der Leber mit der Elektrolyt-Lösung (siehe 2.5.) nimmt die Konzentration der Radioaktivität im ausfließenden Perfusat kontinuierlich ab. Die Messung der Konzentration über einen längeren Zeitraum (21 min) deutet an, daß die anfänglich hohe Rate der Radioaktivitätsabgabe auf

einen mittleren Wert mit relativer Konstanz eingestellt wird, der nach 21 Minuten noch erhalten bleibt (Tab. 11)

4.4.4. Radioaktivitätsabgabe der Leber in das Perfusat im geschlossenen System

Nach Übernahme der Leber ins Perfusionssystem läßt sich eine Freisetzung von radioaktiven Substanzen aus der Leber nachweisen. Dabei wird eine 4-8 fach höhere Konzentration von radioaktivem Material (nach 60 bis 90 Minuten) im Vergleich zum Meßwert nach 2minütiger Perfusion erreicht. Danach wird die Abgabe von Radioaktivität ins Perfusat vermindert. Nach Austausch des Perfusionsmediums mit neu angesetzter Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung hat es den Anschein, als ob ein solcher Vorgang erneut abläuft. Durch die vorgegebene Menge des exogen zugeführten Thymidins wird die vor Perfusatwechsel erzielte Höhe in der Abgabe des radioaktiven Materials nicht mehr erreicht. Die Versuche lassen erkennen, daß es in direkter Proportion zur Dauer der Perfusion und zur Häufigkeit des Perfusatwechsels möglich ist, das radioaktive Material, das nicht zur DNA-Synthese verwendet wurde, durch mehrfache Spülung wieder aus dem Lebergewebe zu entfernen. Da ein Teil dieser nicht eingebauten radioaktiven Verbindung mit in die Radioaktivitätsbestimmung des HClO_4 -Präzipitat eingeht ist es durch die gewählte Methode im Perfusionsexperiment möglich, die Spezifität der Radioaktivitätsbestimmung im säureunlöslichen Präzipitat zu erhöhen(Tab. 12).

Tabelle 9: Gesamtradioaktivität im Perfusat
(n = 38, Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler)

Zeitpunkt der Entnahme nach Beginn der Zugabe von ^3H -Thymidin	Radioaktivität in cpm/ml Perfusat
10 min	71216 $\pm$ 2716
20 min	59600 $\pm$ 2783
30 min	58261 $\pm$ 3133

Tabelle 10: Verfügbarkeit von ^3H -Thymidin (200 μCi in 60 ml Perfusat)
für den Einbau in die DNA nach 30minütiger Perfusion

Versuchs- Nr.	Zeitpunkt der Organ- isolierung nach Teil- hep.	Perfusions- lösung	Dauer der Perfusion	Markierungs- index	Radioaktivität im HClO_4 -Präzipitat
1 a	20 Std	Albumin-KH + ^3H -TdR	30min	16.5	544.1
1 b	20 Std	Übernahme d. konditionierten Perfusat von 1 a	30 min	0.0	11.6
2 a	20 Std	+ ^3H -Albumin-KH + ^3H -TdR	30 min	21.6	1000.5
2 b	20 Std	Übernahme von 2 a	30 min	0.0	21.6

Tabelle 11 : Radioaktivitätsfreisetzung aus der in vivo markierten, regenerierenden Rattenleber während der Perfusion

Versuchs-Tier	Intervall nach Beginn der Perfusion (min)	cpm/ml
1	0 - 4	17792
	4 - 8	15266
	8 - 12	13825
2	0 - 4	104556
	4 - 8	42369
	8 - 12	22274
3	0 - 3	56467
	3 - 6	56205
	6 - 9	17392
	9 - 12	18517
	12 - 15	18490
	15 - 18	16512
	18 - 21	13767

Tabelle 12 : Bestimmung der Radioaktivitätsabgabe der Leber in das Perfusat (cpm/ml) während mehrstündiger Perfusion. Die Ratten wurden 14. oder 20. Stunden nach partieller Hepatektomie in vivo mit ^3H -Thymidin (1 $\mu\text{Ci/g KG}$) oder ^{14}C -Thymidin (0.1 $\mu\text{Ci/g KG}$) markiert. In offener Perfusion wurden die Lebern bis zu 18 min ausgespült. Danach erfolgte rezirkulierende Perfusion und Messung der Radioaktivitätsabgabe aus der Leber in das Perfusat. (PW = Perfusatwechsel)

Perfusions- methode	Perfusions- dauer (min)	Versuchs-Nr.					
		1 (^3H -TdR) (20 h)	2 (^3H -TdR) (14 h)	3 (^{14}C -TdR) (20 h)	4 (^{14}C -TdR) (20 h)	5 (^{14}C -TdR) (14 h)	6 (^{14}C -TdR) (14 h)
<u>offene</u> <u>Perfusion</u>	0 - 2					299	782
	2 - 4					98	339
	4 - 6					281	170
	6 - 8					118	129
	8 - 10					95	132
	0 - 3	41064		382	410		
	3 - 6	48094		557	207		
	6 - 9	30430		267	147		
	9 - 12			195	75		
	12 - 15			169	15		
	15 - 18			116			
	0 - 4		26595				
	4 - 8		21782				
	8 - 12		20006				
<u>rezirkulieren-</u> <u>de Perfusion</u>	2	17383		87	61		41
	10		23395				
	15	36065	105886	284	124	37	84
	30	58432		362	191	197	160
	45			425	199	193	154
	60		132116	457	190	221	163
	75		150049	451	201	218	165
	90		123588	430	210	225	147
	105		141303	508	215	272	135
	120		170916	476	254	297	135
			PW	PW	PW		
	122			390	110	2	
	135		140674	64	76	10	191
	150		145199	96	85	36	180
	165		126798	119	116		
	180			132	104		
	195			164	69		
	200			144			
	210			168	70		
	225			179			
				PW			
	227			63			
	245			99			
	280			103			

4.5. Diskussion

Verteilung und Abbau von injiziertem ^3H -Thymidin erfolgt in vivo sehr rasch (Chang und Looney 1965, Pelc und Appleton 1965, Neubert et al. 1965). Nach Gabe von Thymidin wird es in der Leber abgebaut (Chang und Looney 1965). Die Thymidin-Phosphorylase setzt Thymidin zu Thymin um. Der Hepatozyt kann dann das Thymin zu Dihydro-Thymin reduzieren, das weiter zu Aminoisobuttersture abgebaut wird (Fink et al. 1956). Der Anteil des Thymidins, der in die DNA eingebaut werden kann, ist sehr gering (Lang et al. 1968).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Gesamtradioaktivität im Perfusat kaum abfällt (Tab. 9). Hierbei ergibt sich eine Übereinstimmung mit Versuchen von Gerber und Remy-Defraigne (1963), die jedoch in der Perfusionslösung das Hämoglobin der Erythrozyten als Sauerstoff-Träger verwendeten. Es wurde in diesen Versuchen gefunden, daß nach 30 Minuten 50 % der Radioaktivität zu Tritium-Wasser umgebildet waren.

Die in den Experimenten gefundene Abgabe von Radioaktivität aus der vormarkierten Leber in das Perfusat kann durch den Abbau des Thymidins erklärt werden. Hierfür spricht der Befund, daß die im Perfusat vorhandene Radioaktivität 30 Minuten nach Zugabe von ^3H -TdR nicht mehr in der zum Einbau in die DNA notwendigen Form vorliegt.

Cleaver und Holford fanden 1965 in Versuchen mit L-Zellen, daß diese Zellen einen Pool von ^3H -Thymidin-Phosphat mit langer biologischer Halbwertszeit

bilden. Obwohl die Anreicherung von Radioaktivität im Perfusat durch Abgabe aus der Leber einen ähnlichen Mechanismus in der perfundierten Leber andeutet, muß aus den in Tab. 10 gezeigten Ergebnissen geschlossen werden, daß eine Freisetzung von für die DNA-Synthese verwertbaren Präkursoren nicht in nennenswertem Umfang erfolgt.

In den letzten 15 Jahren wurde in mehreren Untersuchungen eine Markierung von DNA-synthetisierenden Hepatozyten durch Reutilisation aus niedermolekularen DNA-Bruchstücken abgestorbener Zellen beschrieben (Bryant 1963, 1965, Feinendegen et al. 1966, Schultze 1968). Ein solcher Reutilisations-Vorgang war bei Verwendung eines bereits in einem Vorexperiment für 30 Minuten benutzten Perfusats auszuschließen, könnte jedoch bei länger dauernden Perfusionen eine Rolle spielen.

5. Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber im Perfusionssystem nach Hydroxyharnstoff-(HU)-Dauerbehandlung in vivo

5.1. Erörterung des Problems

Der Arbeitskreis, in dem die vorliegende Dissertation entstand, ist seit einigen Jahren unter anderem bemüht, die Teilungssynchronie der teilresezierten Leber durch ein spezifisches, in den Nukleinsäurestoffwechsel eingreifendes Pharmakon, Hydroxyharnstoff (HU), zu erhöhen. Ziel dieser Untersuchungen war es, eine Erhöhung der Zahl von Zellen in einer einheitlichen Zellzyklusphase zu erreichen und dadurch ein möglichst homogenes Gewebematerial für die Analyse der Wachstumsregulation zu gewinnen.

Durch Verwendung von Hydroxyharnstoff gelingt es, die DNA-Synthese in vivo (Schwartz et al. 1965, Philips et al. 1967, Rajewsky 1970, Malkinson et al. 1973) und in vitro (Sinclair 1965, Kim et al. 1967, Pfeiffer und Tolmach 1967, Bacchetti und Whitmore 1969, Bhuyan 1973) zu hemmen. Als Wirkungsmechanismus gilt die Inhibition der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase als gesichert (Young und Hodas 1964, Young et al. 1967, Krakoff et al. 1968, Bacchetti und Whitmore 1969, Moore 1969). Durch seine geringe lebertoxische Wirkung ist HU für Synchronisationsversuche an der Leber geeignet (Schwartz et al. 1965). In den Experimenten wurde die Übernahme eines in vivo entwickelten Modells synchron DNA-synthetisierender Zellen (Iseler 1977) in das Perfusionssystem angestrebt.

Die bisherigen Ergebnisse der Perfusion regenerierender Leber zeigten, daß der Influx von Zellen in das S-Kompartiment von einem oder mehreren Faktoren

abhängig ist, die in den verwendeten Perfusionslösungen offenbar fehlten. Außer exogenen, humoralen Substanzen scheinen jedoch zusätzlich endogene Faktoren am Ende von G_1 als Mediatoren für den Übertritt nach S entscheidend zu sein. Zusätzlich zur Erstellung eines synchron DNA-synthetisierenden Modells in vitro wurde der G_1 -S-Übergang im Perfusionssystem nach Vorbehandlung der Leber mit Hydroxyharnstoff untersucht.

5.2. Methodik

5.2.1. Tiermaterial, Operation, Radioaktivitätszugabe, Bestimmungsmethoden und Technik der Organperfusion

Tiermaterial und Standard-Hepatektomie in Äthernarkose, Zugabe von ^3H -TdR und die radioaktiven Bestimmungsmethoden wurden unter 3.2.1. beschrieben. Die Methode der Organisolierung und der Perfusion waren identisch mit der unter 2.4. beschriebenen Technik. Das Narkoticum (Nembutal 5 mg/100 g KG) wurde den Ratten durch die in der Schwanzvene liegende Infusionskanüle (siehe 5.2.2.2) injiziert.

5.2.2. Technik der Hydroxyharnstoff-Behandlung

5.2.2.1. Zeitpunkt des Beginns der HU-Applikation

Der Beginn des Einbaus von ^3H -TdR in die DNA konnte bei dem verwendeten Tiermaterial zur etwa 15. Stunde nach Teilresektion festgestellt werden (Abb. 2 und 3). Um den Beginn der DNA-Synthese zu unterbinden, wurde mit der HU-Applikation von der 14. Stunde nach Teilresektion ab begonnen.

5.2.2.2. Applikation von Hydroxyharnstoff

HU wurde den Ratten *in vivo* in unterschiedlicher Dosierung (1.25 bzw. $2,5 \times 10^{-3}$ Mol/kg/h) zugeführt. In einigen Perfusionsexperimenten erfolgte Zugabe von HU zum Perfusat. Dabei wurde auf die entsprechende Konzentration im Perfusat umgerechnet (9.5 bzw. 19 mg pro 100 ml).

5.2.2.2.1. Zuführung von HU *in vivo*

Bis zu Beginn des Experiments wurde HU bei 4° C in der Originalpackung ungelöst aufbewahrt. Entsprechend dem Gewicht der Versuchstiere wurde die erforderliche Menge für die Vorinjektion und die Dauerinfusion abgewogen und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Bis zur Verwendung standen die HU-Lösungen im Kühlschrank bei 4° C. Kurz vor Infusionsbeginn wurde die HU-Lösung für die Dauerinfusion in die Perfusor-Spritzen aufgezogen.

5.2.2.2.1.1. Vorinjektion von Hydroxyharnstoff

Die HU-Behandlung der Tiere erfolgte nach der von Iseler (1977) beschriebenen Methode. Die Ratten wurden in bewährter Methode in Äthernarkose in geeignete Käfige gebracht. Durch eine gummiarmierte Öffnung wurde der Schwanz nach außen geführt und fixiert. Nachdem die Schwanzvene freipräpariert war, wurde in diese eine HU-Lösung mit der 1.35fachen Dosis der anschließend pro Stunde infundierten Menge injiziert. Zweck dieser Vorinjektion war der rasche Anstieg der HU-Konzentration im Plasma.

5.2.2.2.1.2. Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff

Nach der 1977 von Iseler beschriebenen Methode wurde auch die HU-Infusion angelegt. In konstanter Flußrate wurden mit Hilfe eines Perfusors (Nr. 4, Braun, Melsungen) die vorbereiteten HU-Lösungen in die Schwanzvene infundiert. Vor Abhängen der Infusion wurde die Durchgängigkeit der Kanüle durch Nachspritzen von 1.0 ml physiologischer NaCl-Lösung und Blutaspiration geprüft. Die tatsächlich infundierte HU-Menge wurde am Ende des Versuches berechnet. Nur einwandfrei infundierte Ratten wurden für die Perfusionsversuche verwendet.

5.2.2.2.2. Zugabe von Hydroxyharnstoff zur Perfusionslösung

In einigen Versuchen wurde dem Perfusat für 30 oder 60 Minuten HU zugesetzt. Als Perfusionslösung diente die üblicherweise verwendete Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung (siehe 2.4.). In 60.0 ml dieser Lösung wurden 9.5 bzw. 19 mg HU gelöst und auf 100.0 ml aufgefüllt (d.e. 1.25 bzw. 1.5×10^{-3} Mol/l). Über das Vorratsgefäß (Abb. 1) wurde diese HU-Albumin-Elektrolyt-Lösung mit der Konzentration 0.095 bzw. 0.19 mg HU/ml Perfusat in das Perfusionssystem eingeleitet.

5.3. Vorversuch

Nach Hemmung der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff sind die Zellen der regenerierenden Leber in vivo nach Absetzen des Pharmakon fähig, die unterbrochene Syntheseleistung fortzusetzen.

Im Anschluß an HU-Dauerinfusionen mit unterschiedlicher Dauer (6.5 oder 16 Stunden) und mit der Dosis 1.25×10^{-3} Mol/kg/h erfolgte Übernahme der Lebern ins Perfusionssystem. Der Grad der Hemmung der DNA-Synthese und der Beginn der DNA-Synthese nach HU-Applikation wurden im Perfusionssystem untersucht.

5.3.1. Versuchsaufbau

12 Ratten im Gewicht von 176-202 g wurden in Äthernarkose nach 3.2.1. teilreseziert. Die Tiere wurden in drei Gruppen (A, B und C) zu je vier Ratten eingeteilt.

Die Tiere der Gruppe A wurden von der 14. bis 20.5 Stunde nach Teilresektion mit einer HU-Dosis von 1.25×10^{-3} Mol/kg/h dauerinfundiert. In einem Kontroll-Experiment wurde die Leber mit der üblichen Albumin-Elektrolyt-Lösung perfundiert. In den restlichen drei Versuchen war dieser Lösung HU zugegeben (9.5 mg/100 ml). Dabei wurde das Pharmakon nach 60 Minuten durch Perfusat-Wechsel wieder aus der Perfusionslösung entfernt.

Den vier Ratten der Gruppe B wurde HU von der 14. bis 30. Stunde nach Zweidrittel-Hepatektomie infundiert (Dosis : 1.25×10^{-3} Mol/kg/h). In allen Experimenten erfolgte Durchströmung mit Hydroxyharnstoff im Perfusat (9.5 mg/100 ml) für 60 min. Das Experiment wurde danach beendet (Tier 1) oder wurde mit unterschiedlicher Dauer (1.5 bzw. 5.5 Std) nach Perfusatwechsel fortgesetzt (Tier 2,3 und 4).

Dem Perfusat der Tiergruppe C war im Gegensatz zur Gruppe B kein HU zugesetzt. Die Dauer der Experimente war unterschiedlich (0.5 h, 1 h, 3.5 h und 5.5 h).

In allen Experimenten der Gruppen A, B und C wurde 30 Minuten vor Beendigung des Versuches ^3H -Thymin (200 μCi) ins Perfusat (60 ml) zugegeben.

5.3.2. Ergebnisse

5.3.2.1. DNA-Synthese im Perfusionssystem nach Aufhebung des HU-Blockes

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Gruppen A, B und C eingetragen. Sie weisen auf einen raschen Beginn der DNA-Synthese nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion in vivo und nach Übernahme der Leber ins Perfusionssystem hin.

5.3.2.2. Infusionsdauer : 14.-20.5 Stunde nach partieller Hepatektomie

Nach 6.5 stündiger HU-Infusion mit der Dosis $1.25 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$ und anschließender 60minütiger Perfusion der Leber ohne HU im Perfusat ergibt sich ein Markierungsindex von 14.2 % , dem ein Radioaktivitätsgehalt von 297 cpm/mg HClO_4 -Präzipitat entspricht. Nach 2.5 stündiger Perfusion, wobei während der ersten 60 min HU (9.5 mg/100 ml) dem Perfusat zugesetzt war, läßt sich ein Anstieg sowohl des Markierungsindex (19.7%) wie der Radioaktivität im HClO_4 -Präzipitat nachweisen (557.1 cpm/mg). Nach Durchströmungsversuchen mit längerer Dauer (5.5 bzw. 7 Stunden) zeigt der Markierungsindex und die Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitates eine Abnahme auf den Ausgangswert der 60minütigen Perfusion (Tab.13,Gruppe A).

5.3.2.3. Infusionsdauer : 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie mit Hydroxyharnstoff für 60 Minuten im Perfusat

Obwohl HU für 60 Minuten dem Perfusat zugesetzt war (9.5 mg/100 ml), ist während des Radioaktivitätsangebotes (30. bis 60. Minute) eine DNA-Synthese zu beobachten (Markierungsindex 36.6 %, HClO_4 -Präzipitat 559 cpm/mg). Perfusion von 90 Minuten nach Entfernung des HU aus der Perfusionslösung führt nicht zur Veränderung des Markierungsindex, zeigt aber einen Anstieg des Radioaktivitätsgehaltes im HClO_4 -Präzipitat. Verlängerung der Perfusionsdauer um weitere 4 Stunden hat eine beträchtliche Zunahme des Markierungsindex zur Folge (von 36.6 auf 52.5 %). Der Radioaktivitätsgehalt des Perchlorsäure-Präzipitates steigt dagegen nur geringfügig an (von 1359.5 auf 1485.7 cpm/mg) (Tab 13, Gruppe B).

5.3.2.4. Infusionsdauer : 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie ohne HU im Perfusat

Die Werte der Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat liegen im Bereich gleicher Größenordnung. Demgegenüber steht ein kurzfristiger Anstieg des Markierungsindex zwischen der 30. bis 60. Minute, dem ein Abfall in den folgenden 4.5 Stunden auf 32.6 % folgt (Tabelle 13, Gruppe C).

5.3.2.5. Beziehung zwischen Hydroxyharnstoff-Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen

Der Vergleich der Ergebnisse von Tiergruppe A (Infusionsdauer 6.5 h) und

von Tiergruppe C (Infusionsdauer 14 h) zeigt eine eindeutige Abhängigkeit des Radioaktivitätsgehaltes des Perchlorsäure-Präzipitates (zur 60. Minute : 297.0 zu 2310.9 cpm/mg) und des Markierungsindex (von 14.2 auf 60.0%) von der Dauer der HU-Infusion in vivo. Verlängerte Infusion führt zu einer erhöhten Synchronie des DNA-Synthese-Beginns.

5.3.2.6. Hemmungsgrad der DNA-Synthese im Perfusionssystem durch Perfusion mit Hydroxyharnstoff im Perfusat

Anwesenheit von Hydroxyharnstoff im Perfusat übt einen partiell hemmenden Einfluß auf die DNA-Synthese aus. Nach 60minütiger Perfusion steht einer ungehemmten DNA-Synthese mit Werten von 60.0 % markierten Zellen und eines Radioaktivitätsgehaltes von 2310.8 cpm/mg säureunlösliches Präzipitates, eine zum Teil gehemmte Syntheseleistung mit Werten von 36.6 % markierter Zellen und 559.0 cpm/mg Präzipitat gegenüber (Tab. 13, Tier-Nr. B-1 und C-2).

5.3.3. Diskussion

Nach Absetzen des HU-Blockes nach Dauerinfusion in vivo ist in den proliferierenden Hepatozyten die Fähigkeit, Desoxyribonukleinsäure zu synthetisieren, erhalten (Rabes et al. 1977). Diese Fähigkeit bleibt auch in der isoliert perfundierten, regenerierenden Leber nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion nachweisbar. Das Ausmaß des Kompartiments DNA-synthetisierender Zellen ist abhängig von der Dauer des HU-Blockes in vivo (Rabes et al. 1977). Daraus ergibt sich ein Zuwachs von DNA-synthetisierenden Leberzellen beim Vergleich zwischen der 6.5 und 16.0

Tabelle 13 : Markierungsindex und ^3H -TdR-Inkorporation perfundierter regenerierender Rattenleber nach Infusion von HU (1.25×10^{-3} Mol/kg/h) in vivo für 6.5 oder 16.0 Stunden

Tier- Gruppe	Perfusions- medium	Tier- Nr.	Dauer der HU- Infusion in vivo (Std nach Teil- hepatektomie)	Dauer der Perfusion	Radioaktivität im Präcipitat (cpm/mg)	Markierungs- index
A	Albumin-KH	1	14 - 20.5	1.0 h	297.0	14.2 %
	Albumin-KH + HU für 60 min	2	14 - 20.5	2.5 h	557.1	19.7 %
		3	14 - 20.5	3.5 h	553.8	11.3 %
		4	14 - 20.5	7.0 h	240.0	14.4 %
B	Albumin-KH + HU für 60 min	1	14 - 30.0	1.0 h	559.0	36.6 %
		2	14 - 30.0	2.5 h	681.8	27.5 %
		3	14 - 30.0	2.5 h	2037.1	45.6 %
		4	14 - 30.0	6.5 h	1485.7	52.5 %
C	Albumin-KH	1	14 - 30.0	0.5 h	2227.1	40.5 %
	Albumin-KH	2	14 - 30.0	1.0 h	2310.9	60.0 %
	Albumin-KH	3	14 - 30.0	3.5 h	2577.8	41.2 %
	Albumin-KH	4	14 - 30.0	5.5 h	—	32.6 %

stündiger HU-Dauerinfusion. Dieses als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie und HU-Dauerinfusion sich vergrößernde S-Kompartiment kann für die gewählten Perfusionsverhältnisse bestätigt werden (Tab. 13 Gruppe A und C).

Obwohl Hydroxyharnstoff in einigen Experimenten auch im Perfusat enthalten war, synthetisieren bereits in der ersten Stunde der Perfusion nahezu 37 Prozent der Hepatozyten DNA. Die Konzentration von Hydroxyharnstoff im Blut und in den Organen ist abhängig von der zugeführten Dosis und vom Abbau in der Leber (Philips et al. 1967, Colvin und Bono 1970, Fabricius und Rajewsky 1971). Die Halbwertszeit von HU im Plasma von intakten Tieren liegt zwischen 15 Minuten (Wilson et al. 1975) und 35 Minuten (Philips et al. 1967). Ein Anstieg der Halbwertszeit auf 61 Minuten wurde in Untersuchungen nach Teilhepatektomie gefunden (Fabricius und Rajewsky 1971). Eine Dosis größer oder gleich 1.25 m Mol/kg/h (Rabes et al. 1977) ist bei zweidrittelhepatektomierten Ratten größer als die Rate von Leberabbau und Nierenexkretion (Philips et al. 1967). Es ist wahrscheinlich, daß im Perfusionssystem bei Zusatz von 9.5 mg HU/100 ml in der Zeitspanne bis zum Angebot von ^3H -Thymidin (30 Minuten nach Perfusionsbeginn) die Schwelle der Hemmkonzentration durch den in der perfundierten Leber stattfindenden Abbau unterschritten wird und somit die DNA-Synthese nicht in allen Hepatozyten blockiert wird.

Für den Nachweis des Influx von Hepatozyten regenerierender Leber in die S-Phase ist eine möglichst komplette Arretierung der proliferierenden Zellen an der G_1 -S-Grenze zu fordern. Da in der gewählten Dosis von 1.25 m Mol/kg/h in der Dauerinfusion und im Perfusat von 9.5 mg HU/100 ml die Blockade der Zellen an der G_1 -S-Grenze unvollständig war, wurde im Hauptversuch die doppelte Dosierung verwendet.

5.4. Hauptversuch

5.4.1. Versuchsanordnung

39 männliche Wistarratten wurden wie unter 3.2.1. beschrieben in Äthernarkose teilhepatektomiert. Die Tiere wurden in zwei Gruppen für kurzzeitige (14. bis 22. Stunde nach Teilresektion, 9 Tiere) und für langzeitige Dauerinfusion (14. bis 30. Stunde nach Teilresektion, 30 Tiere) eingeteilt. Die verwendete Dosis in den Hydroxyharnstoff-Dauerinfusionen war 2.5×10^{-3} Mol/kg/h.

In einigen Experimenten wurde zur Vermeidung einer Systeminsuffizienz bei langdauernden Perfusionen ein Intervall von zwei Stunden zwischen HU-Dauerinfusion und Beginn der Organdurchströmung gelegt. In diesen Versuchen wurde bei Beendigung der HU-Infusion die Infusionsschläuche abgenommen und die Tiere in den Käfigen belassen. Vor Entnahme zur Perfusion wurde den Ratten 0.2 ml Nembutal (d.e. 5 mg/100 g KG) i.p. injiziert. Durch diese Modifikation des Versuchsaufbaus war eine Unterteilung der Tiergruppe B in einen ersten Teil mit Perfusion unmittelbar nach HU-Dauerinfusion und einen zweiten Teil mit Perfusion nach 2stündigem Intervall erforderlich.

Die Perfusionen waren von unterschiedlicher Dauer (0.5 h, 1 h, 3 h, 5 h oder 7 h). Als Perfusionsmedium diente Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung (siehe 2.5.). In allen Versuchen wurde die DNA-Syntheseleistung durch Angebot von $200 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$ im Perfusat (60 ml) dreißig Minuten vor Versuchsende bestimmt.

Zur Messung des Grades der DNA-Synthese-Hemmung wurde in einigen 30minütigen Perfusionen dem Perfusat Hydroxyharnstoff in der Konzentration von 19 mg/100 ml (2.5 mM) zugegeben. Die Bestimmungsmethoden der DNA-Synthese-Leistung sind unter 3.2.1. beschrieben.

5.4.2. Ergebnisse

5.4.2.1. Reversibilität der gehemmten DNA-Synthese im Perfusionssystem nach Aufhebung des HU-Blockes (Dosis : 2.5×10^{-3} Mol/kg/h)

Der Einbau von ^3H -TdR in das säureunlösliche Präzipitat und der Nachweis von markierten Zellen in den Autoradiogrammen beweist die ablaufende DNA-Synthese in der perfundierten, regenerierenden Leber nach Aufhebung der hemmenden Wirkung von Hydroxyharnstoff (Abb. 7).

5.4.2.2. Infusionsdauer von Hydroxyharnstoff von der 14. bis 22. Stunde nach Teilresektion und anschließende Leberperfusion von unterschiedlicher Dauer

In Tabelle 14 läßt sich eine eindeutige Beziehung zwischen dem Radioaktivitätseinbau in das HClO_4 -Präzipitat und dem Markierungsindex einerseits und der Dauer der Perfusion andererseits nicht sicher nachweisen. Als Ursachen sind die geringe Anzahl von Experimenten und die beträchtliche Streubreite der Größe des S-Kompartiments zu dem frühen Zeitpunkt (22. Stunde nach partieller Hepatektomie) anzusehen.

5.4.2.3. Infusionsdauer von Hydroxyharnstoff von der 14. bis 30. Stunde nach Teilresektion und anschließende Leberperfusion von unterschiedlicher Dauer

Der Radioaktivitätsgehalt im Präzipitat steigt nach Beendigung der Hemmphase der DNA-Synthese steil an. Der Maximalwert wird etwa 5 Stunden nach Perfusionsbeginn erreicht. Zwischen der 5. und 7. Stunde nach Perfusionsbeginn fällt die Kurve mit steilem Schenkel ab. Aus dem Kurvenverlauf ist eine Dauer der S-Phase von 6.5 Stunden zu errechnen (Abb. 6)

Für die Bestimmung der Größe des S-Kompartiments ist die autoradiographische Auswertung erforderlich. Dabei zeigt sich ein Anstieg des Markierungsindex innerhalb von einer Stunde von 5.7 % auf 47.2 %. Nach diesem rapiden Zuwachs der Zellen im S-Kompartiment tritt innerhalb der darauffolgenden noch eine relativ geringe Zunahme auf etwa 64.3 % markierter Zellen ein. Zwischen der 6. und 7. Stunde nach Perfusionsbeginn, gleichbedeutend mit der Stundenzahl nach Aufhebung des HU-Blockes, fällt die Kurve des Markierungsindex auf 0.3 % ab (Abb. 6).

5.4.2.4. Perfusionen nach 2stündigem Intervall zwischen Absetzen der HU-Dauerinfusion und dem Beginn des Durchströmungsversuches

Zur Unterscheidung von überlagernden Effekten zwischen Insuffizienz des Perfusionssystems nach mehrstündigen Versuchen und zellzyklusspezifischer, abnehmender DNA-Synthese-Leistung wurden einige Versuche auf der Grundlage der unter 5.4.1. beschriebenen Methode, mit Bildung eines zweistündigen Intervalls zwischen HU-Infusion und Perfusionsbeginns, durchgeführt. Die

Ergebnisse bestätigen den Befund des abfallenden Kurvenschenkels im Sinne eines Austritts von Zellen aus dem S-Kompartiment sowohl der Kurve des Markierungsindex wie des Radioaktivitätsgehaltes im säure-unlöslichen Präzipitat. Die dabei auftretende zeitliche Verzögerung (Tab. 15) ist durch das Nachspritzen von Hydroxyharnstoff bei Abhängen der HU-Infusionsleitungen bedingt.

5.4.2.5. Bestimmung der DNA-Synthese-Rate nach Hydroxyharnstoff-Infusion von der 14. bis 30. Stunde nach partieller Hepatektomie und anschließende Leberperfusion

In Annäherung ist die Geschwindigkeit der DNA-Synthese als Verhältnis von Radioaktivität im HClO_4 -Präzipitat und Markierungsindex zu bestimmen. Die DNA-Synthese-Rate nach HU-Dauerinfusion (2.5 mM/kg/h) zwischen der 14. und 30. Stunde nach Teilresektion und anschließender Leberperfusion ist in Tabelle 16 dargestellt. Zwischen der 1. und 5. Perfusionsstunde steigt die DNA-Synthese-Rate um den Faktor 1.7 und fällt zwischen der 5. und 6. Perfusionsstunde um etwa 34 % ab.

5.4.2.6. Beziehung zwischen Hydroxyharnstoff-Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen

Aus den maximalen Werten der Markierungsindices (Infusionsdauer 8 Stunden : 23.3 %, Infusionsdauer 16 Stunden : 64.3 %) ist eine direkte Beziehung zwischen dem Synchronisationsgrad der DNA-synthetisierenden Zellen und der Dauer der vorangehenden HU-Infusion ersichtlich.

5.4.2.7. Hemmungsgrad der DNA-Synthese durch Perfusion mit HU (2.5 mM) im Perfusat nach HU-Dauerinfusion

Eine vollständige Hemmung der DNA-Synthese war bei den Versuchen mit 30minütigen Perfusionen bei gleichzeitiger Anwesenheit von HU im Perfusat nur in einem Versuch möglich (Tab. 17). Der signifikant steile Anstieg innerhalb der ersten Perfusionsstunde deutet aber den hohen Wirkungsgrad der Blockade bei Verwendung einer Dosis von 2.5×10^{-3} Mol/kg/h an. Die Steilheit des abfallenden Schenkels besonders zwischen der 6. und 7. Stunde nach Absetzen des HU-Blockes weist ebenso auf den hohen Synchronisationsgrad der DNA-synthetisierenden Hepatozyten hin.

5.4.2.8. Nachweis des Sauerstoffs als notwendiger Faktor der DNA-Synthese

Aus nicht bekannten Gründen war in zwei Perfusionsexperimenten die Sauerstoffzufuhr nicht ausreichend. Dadurch ergaben sich ausgedehnte nekrotische Bezirke an der Peripherie des Leberacinus im histologischen Präparat, vornehmlich in der intermediären und der perivenösen Zone des Leberacinus. An der Oberfläche der perfundierten Leber diffundiert der Luft-sauerstoff in die begrenzenden Zellschichten. In diesem Leber-Rand-Bereich wurden DNA-synthetisierende Hepatozyten in großer Zahl im Autoradiogramm nachgewiesen. Als ungefähre Sauerstoff-Diffusionsstrecke ergab sich aus der Lokalisation DNA-synthetisierender Zellen eine Randzone von 90 μm Tiefe (der mittlere Fehler des Mittelwertes von 15 Meßwerten betrug 10 μm) (Abb. 8).

Tabelle 14 : ^3H -TdR-Markierungsindices und ^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präcipitat der regenerierenden Rattenleber nach HU-Dauerinfusion von der 14. bis 22. Stunde nach partieller Hepatektomie ($2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$) und anschließende isolierte Perfusion von unterschiedlicher Dauer

Dauer der Perfusion	Perfusionsmedium	Radioaktivität im Präcipitat (cpm/mg)	^3H -TdR-Markierungsindex
0.5 h	Albumin-KH + HU	887	4.6 %
		1507	5.1 %
0.5 h	Albumin-KH	3743	14.0 %
		887	26.5 %
1.0 h	Albumin-KH	2464	22.1 %
		618	5.3 %
2.0 h	Albumin-KH	2108	9.4 %
3.0 h	Albumin-KH	3312	19.4 %
5.0 h	Albumin-KH	1350	13.4 %

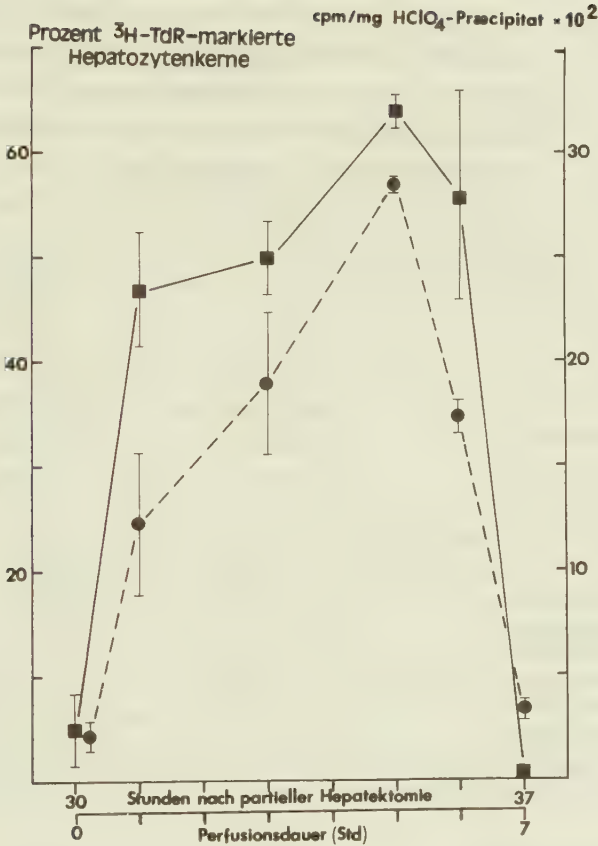


Abb. 6

^3H -TdR-Markierungsindex (linke Ordinate) und ^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präcipitat (rechte Ordinate) nach HU-Dauerinfusion von der 14. bis 30. Stunde nach partieller Hepatektomie (2.5×10^{-3} Mol/kg/h) und anschließende isolierte Perfusion von unterschiedlicher Dauer (Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler)

Tabelle 15: Vergleich der ^3H -TdR-Markierungsindices und der ^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präcipitat der regenerierenden Rattenleber zwischen Perfusionen unmittelbar nach Absetzen der HU-Dauerinfusion und Perfusionen nach 2stündigem Intervall zwischen Absetzen der HU-Dauerinfusion und Beginn der Perfusion ($2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$ für 16 Stunden). Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler.

Versuchsanordnung	^3H -TdR-Markierungs- index	^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präcipitat (cpm / mg)
6 stündige Perfusion unmittelbar nach HU-Dauerinfusion	$56.1\% \pm 10.1\%$ (n = 4)	1738.6 ± 75.2 (n = 4)
4 stündige Perfusion nach 2 stündigem Intervall	$60.5\% \pm 23.0\%$ (n = 4)	1415.3 ± 710.8 (n = 4)
7 stündige Perfusion unmittelbar nach HU-Dauerbehandlung	0.1 % 0.5 %	284.1 393.9
5 stündige Perfusion nach 2 stündigem Intervall	$25.0\% \pm 24.8\%$ (n = 3)	508.0 ± 300.1 (n = 3)

Tabelle 16 : DNA-Syntheserate der Hepatozytenkerne nach 16stündiger HU-Infusion (14. bis 30. Stunde nach partieller Hepatektomie, 2.5×10^{-3} Mol/kg/h) und anschließende isolierte Leberperfusion von unterschiedlicher Dauer. Die DNA-Syntheserate wurde aus dem Quotienten der ^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präzipitat und dem ^3H -TdR-Markierungsindex errechnet.

Perfusionsmedium	Perfusionsdauer (Std)	DNA-Syntheserate
Albumin-KH + HU	0.5	38.7
Albumin-KH	0.5	18.7
Albumin-KH	1.0	26.1
Albumin-KH	3.0	38.1
Albumin-KH	5.0	44.3
Albumin-KH	6.0	31.0

Tabelle 17 : Bestimmung der Hemmwirkung von HU auf die DNA-Synthese durch Vergleich von 30minütigen Perfusion mit und ohne HU im Perfusat nach HU-Dauerinfusion in vivo (14.-30. Stunde nach Teilhepatektomie, 2.5×10^{-3} Mol/kg/h).

Perfusionsmedium	^3H -TdR-Markierungsindex	^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präzipitat (cpm/mg)
Albumin-KH + HU	0.1 %	53.5
	2.1 %	389.8
	8.1 %	185.0
	18.4 %	366.7
	0.0 %	109.0
Albumin-KH	11.6 %	191.0
	41.7 %	634.7
	28.0 %	717.5

Abb. 7 : Autoradiogramm einer fünf Stunden perfundierten Rattenleber nach HU-Dauerinfusion in vivo (2.5 mMol/kg/h) von der 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie. Zugabe von ^3H -TdR (200 μCi in 60 ml Perfusat) erfolgte nach 4.5 stündiger Perfusion mit Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung. Vergrößerung 120fach.

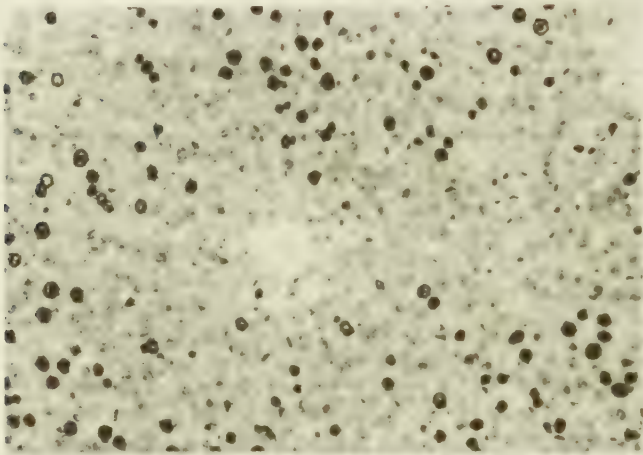
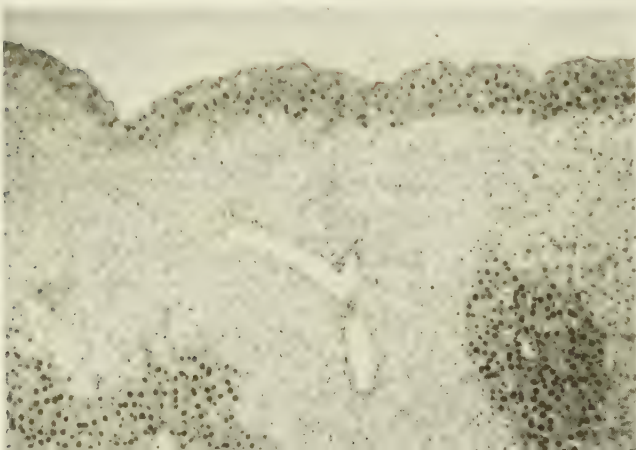


Abb. 8 : Autoradiogramm einer sechs Stunden perfundierten Rattenleber nach HU-Dauerinfusion in vivo (2.5 mMol/kg/h) von der 14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie. Zugabe von ^3H -TdR (200 μCi in 60 ml Perfusat nach 5.5stündiger Perfusion. Infolge verminderter O_2 -Zufuhr konnte die DNA-Synthese nur in Bereichen mit ausreichendem O_2 -Angebot durchgeführt werden. Vergrößerung 40fach.



5.4.3. Diskussion

Nach Teilhepatektomie beantwortet das restliche Lebergewebe den Zellverlust mit starker proliferativer Aktivität. Die Lokalisation der Zellproliferation ist von der unterschiedlichen Länge der G_1 -Phase der Hepatozyten im Leberläppchen abhängig (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Fabrikant 1968, Rabes und Tuzcek 1970). Der Übertritt von Zellen aus dem G_1 - in das S-Kompartiment ist an die Intaktheit spezifischer Enzymaktivitäten, z. B. der Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase, gebunden. Durch Hydroxyharnstoff gelingt es, die Aktivität des Enzyms zu hemmen (Young und Hodas 1964, Young et al. 1967, Krakoff et al. 1968, Bacchetti und Whitmore 1969, Moore 1969). Veränderungen der Pools von DNA-Vorläufern sind die Folge (Walters et al. 1973, Plagemann und Erbe 1974). Der Ablauf der DNA-Synthese wird durch den Mangel an Desoxyribonucleosidtriphosphaten gehemmt.

Nach Beendigung der Hydroxyharnstoff-Applikation beginnen die Zellen synchron DNA zu synthetisieren (Rabes et al. 1976, 1977). Der Nachweis der reversiblen Hemmwirkung des HU auf die DNA-Synthese gelingt im Perfusionssystem nach HU-Dauerinfusion mit der Dosis 1.25×10^{-3} und 2.5×10^{-3} Mol/kg/h (Tab. 13 und Abb. 6).

Aus den Ergebnissen von Tabelle 17 läßt sich ablesen, daß die Bildung von DNA auch im Perfusionssystem bei gleichzeitiger Anwesenheit von Hydroxyharnstoff im Perfusat in beträchtlichem Maße zu hemmen. Versuche ohne Hydroxyharnstoff über den gleichen Zeitraum der Perfusion (30 min) zeigen, daß dabei die Synthese-Leistung wesentlich erhöht ist. Zusammen mit dem

nachfolgenden steilen Anstieg des Markierungsindex und des Radioaktivitätsgehaltes des säureunlöslichen Präzipitates nach Absetzen des HU deutet sich ein Übertritt von Zellen in das S-Kompartiment unter den gewählten Bedingungen an. Als Ursache ist eine intrazelluläre Anreicherung von den G_1 -S-Influx stimulierenden Mediatoren während der langdauernden HU-Behandlung zu diskutieren.

Walters et al. (1976) fanden bei Untersuchungen mit Chinese hamster cells einen hemmenden Effekt von Hydroxyharnstoff in der frühen S-Phase. Bis zu diesem Zellzyklusabschnitt rückten die Zellen auch in Gegenwart von HU vor. Bis die HU induzierte, exakte Lokalisation der Zellen im Zyklus für regenerierende Leberzellen nicht abgeklärt ist, darf der Übertritt von Zellen aus G_1 nach S im Perfusionssystem nach HU-Dauerbehandlung in vivo nicht als bewiesen gelten, sondern es könnte bereits in vivo ein Influx nach S stattgefunden haben. . Dieser Vorbehalt schränkt die Verwendbarkeit des beschriebenen Perfusions-Modells für Untersuchungen zum Mechanismus des G_1 -S-Influx stark ein.

Im Perfusionssystem sind fünf Stunden nach Aufhebung des Hydroxyharnstoff-Blockes etwa 64 % der Hepatozyten in der DNA-Synthese-Phase. Es befinden sich somit nahezu zwei Drittel aller Leberzellen in der gleichen Zellzyklus-Phase. Die Ansammlung dieses homogenen Zellmaterials und die gegenüber physiologischen Verhältnissen konstanten funktionellen Aktivitäten ohne Interferenzen mit den Erfordernissen des Organismus macht dieses Modell für Analysen der Vorgänge während der S-Phase des Zellzyklus wertvoll.

Als Ursache für die heterogenen Ergebnisse im Markierungsindex und dem Radioaktivitätsgehalt im $HClO_4$ -Präzipitat von Tabelle 15 sind neben der geringen Versuchszahl zahlreiche Faktoren zur diskutieren. Außer unterschiedlichen

Streß-Bedingungen, denen die Tiere vor, während und zwischen den operativen Eingriffen (Teilhepatektomie und Organisolierung) ausgesetzt sind, müssen tierindividuelle Faktoren als Antwort auf Zweidrittel-Hepatektomie und Organisolierung berücksichtigt werden. Nach sechzehnstündiger Dauer der Hydroxyharnstoff-Infusion ist ein Ausgleich von zeitlichen Differenzen im Beginn der DNA-Synthese bis zum Absetzen des HU-Blockes wahrscheinlicher als zu früheren Zeitpunkten nach Teilhepatektomie.

Die Zellzyklus-Zeit ist nach Hydroxyharnstoff-Applikation in vivo (Pfeiffer und Tolmach 1967, Rabes et al. 1977) und in vitro (Dethlefsen und Riley 1973) verkürzt. Die Dauer der S-Phase verringert sich gegenüber normalem regenerieren, den Lebergewebe von etwa 7.5 Stunden (Rabes et al. 1976) auf etwa 6.5 Stunden (Rabes et al. 1977). Diese Verkürzung der S-Phasen-Länge um etwa eine Stunde konnte unter Perfusionsbedingungen bestätigt werden.

Ein Vergleich der Kurvenverläufe von Markierungsindices und ^3H -TdR-Inkorporation in das Perchlorsäure-Präzipitat (Abb 6) zeigt, daß beide Kurven ihr Maximum nach unterschiedlichem Verlauf erreichen. Die zeitliche Verzögerung des Radioaktivitätseinbaus in das Lebergewebe könnte durch die inkonstante DNA-Syntheserate der Einzelzelle bedingt sein (Painter und Schaefer 1971). Die Ergebnisse der aus dem Verhältnis von ^3H -TdR-Inkorporation in das HClO_4 -Präzipitat und den Markierungsindices errechneten DNA-Syntheserate sind in Tabelle 16 eingetragen. Die DNA-Syntheserate erhöht sich bei nur gering ansteigendem Markierungsindex von der ersten bis zur fünften Stunde um das 1.7 fache. Die unterschiedlichen Werte der DNA-Syntheserate in den ersten dreißig Minuten nach Absetzen des HU-Blockes, im Vergleich zwischen den Experimenten mit und ohne Hydroxyharnstoff im Perfusat, deuten an, daß sich die Zellen trotz HU-Anwesenheit im Perfusat in der DNA-Synthese-Phase befinden, die Intensität der Markierung jedoch unter dem sichtbaren Schwellenwert liegt.

Der Befund des niedrigen Markierungsindex (0.3 %) nach siebenstündiger Perfusion nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion in vivo (Abb. 6) deutet eine Insuffizienz der gewählten Perfusionsbedingungen nach langdauernden Perfusionsversuchen an. Nach einer Perfusions-Dauer von 3-5 Stunden fällt der Durchfluß in der Leber ab (Gerber und Remy-Defraigne 1963). Ein Teil des Perfusats fließt durch den Lymphstrom über die Leberoberfläche ab. Dieser Anteil, der zu Beginn der Perfusion 10-20 % des Perfusatvolumens beträgt, steigt mit Dauer der Perfusion an und kann nach 3 - 4 Stunden 40-45 % erreichen (Scholz 1967). Damit scheint der Abfall des Markierungsindex auf 0.3 % nach siebenstündiger Perfusion nach HU-Dauerinfusion in vivo (14.-30 Stunde, Dosis : 2.5×10^{-3} Mol/kg/h) methodisch bedingt und nicht Ausdruck einer verminderten DNA-Syntheserate zu sein. Der Vergleich von Versuchen mit und ohne Intervall zwischen Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung und Perfusionsbeginn zeigt aber eindeutig, daß die Kurve des Markierungsindex sich zur 6. Perfusionsstunde im steil abfallenden Schenkel befindet (Tab 15). Der höhere Markierungsindex der Versuche mit einem Intervall (2 Stunden) zwischen Absetzen der HU-Dauerinfusion und dem Perfusionsbeginn ist durch die unterschiedliche Konzentration von Hydroxyharnstoff im Plasma und Gewebe (Nachspritzen von HU bei Abnahme der Infusionsleitungen) erklärbar. In diesen Versuchen bleibt eine relativ hohe Konzentration in Plasma und Lebergewebe bestehen, die durch die Leber (Philips et al. 1967, Colvin und Bono 1970, Fabricius und Rajewsky 1971) abgebaut werden muß, bis die Hemmkonzentration von Hydroxyharnstoff unterschritten wird und die Synthese von DNA beginnt. Diese Versuche mit Zwischenschaltung eines Intervalls, nach Beendigung der HU-Dauerinfusion und vor Perfusionsbeginn stellen zumindest einen Hinweis dar, daß der abfallende Kurvenschenkel zwischen der 6. und 7. Stunde (Abb.6) nicht durch Insuffizienz der Perfusionsverhältnisse bedingt war, sondern auf den Efflux der Zellen aus dem S- in das G₂-Kompartiment zurückgeführt werden könnte.

Analysen der Zellzyklus-Kompartimente von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie ergaben, daß die meisten der Hepatozyten, die zur 27. Stunde nach Teilhepatektomie markiert sind, die DNA-Synthese zur 34. Stunde nach Zweidrittel-Resektion verlassen haben. Zwischen der 34. und 40. Stunde nach Zweidrittel-Hepatektomie nimmt der ^3H -TdR-Markierungsindex der perivenös gelegenen Hepatozyten von 5 % auf 20 % zu. (Rabes et al. 1976). Im Perfusionsversuch (Abb. 6) befanden sich nach 7stündiger Perfusion (d.e. im Versuch der 37. Stunde nach Teilresektion) nur noch 0.3% der Zellen in der DNA-Synthese-Phase. Da nach den angeführten Analysen von Rabes et al. (1976) in vivo zu diesem Zeitpunkt nach Hepatektomie noch Zellen in die S-Phase eintreten, darf das nahezu vollständige Verlassen des S-Kompartiments mit einem Markierungsindex von 0.3 % als ein weiterer Hinweis dafür gelten, daß Zellen nicht in der Lage sind, nach mehrstündigen Perfusionen von G_1 nach S einzutreten. Dies erlaubt keine analoge Schlußfolgerung für den kurzfristigen Perfusionsversuch (30 min) unmittelbar nach Absetzen des Hydroxyharnstoff-Blockes, da in dieser Versuchsanordnung durch Akkumulation von Zellen nahe der G_1 -S-Grenze eine grundsätzlich verschiedene Zellzykluskompartimentierung gegeben ist.

Für die Durchführung der DNA-Synthese sind Sauerstoff und energiereiche Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Verminderung der Sauerstoffzufuhr, wie in zwei Versuchen geschehen (siehe 5.4.2.8.), führt zur Unterbrechung der DNA-Synthese und zur Nekrobiose der Hepatozyten. An der Organoberfläche kann Sauerstoff infolge des O_2 -Partialdruckes über der Leber in die begrenzenden Zellschichten diffundieren.

Durch den Einbau spezifischer radioaktiv markierter Verbindungen (^3H -TdR) als Meßgröße für die Bestimmung von spezifischen Reaktionen im Stoffwechsel der Zellen und durch die O_2 -Konzentrations-Differenz im Lebergewebe (zwischen zugeführtem, vermindertem O_2 -Gehalt des Perfusats und dem

Sauerstoff-Partialdruck an der Leberoberfläche) kann O_2 als ein essentieller Faktor der DNA-Synthese nachgewiesen werden. Zusätzlich kann aus der O_2 -Eindringtiefe auf den O_2 -Verbrauch des Gewebes geschlossen werden. Bereits 1923 gelang es Warburg für die Sauerstoff-Eindringtiefe in einen planparallelen Gewebsschnitt, bei dem die O_2 -Konzentration im Inneren gleich Null ist, die Beziehung nachzuweisen:

$$d' = \sqrt{8 C_o \frac{D}{A}}$$

d' stellt die Dicke des Grenzschnittes dar

C_o ist die O_2 -Konzentration an der Oberfläche des Schnittes

D ist der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff für ein spezifisches Gewebe

A ist der O_2 -Verbrauch des Gewebes in der Zeiteinheit

Für eine entsprechende Beziehung für die Grenzschnittsdicke eines Kugel-Radius gilt:

$$r' = \sqrt{6 \frac{C_o D}{A}} \quad (\text{Quastler 1963})$$

Die Sauerstoff-Eindringtiefe differiert zwischen Kugel und Planschnitt um den Faktor 2 (0.2 atm : $d'/2 = 0.1 \text{ mm}$ ——— $r = 0.18 \text{ mm}$).

Wrba et al. (1966) fanden in Untersuchungen an Leberexplantaten eine durchschnittliche Breite der vitalen Randzone im Bereich zwischen den Werten von Planschnitt und Kugel.

Nach Barcroft (1912) gilt für den O_2 -Verbrauch des Lebergewebes (d. i. in der Formel: A) ein Höchstwert in der unbehandelten, adulten Rattenleber von $5 \times 10^{-2} (\text{cm}^3 O_2 / \text{cm}^3 \text{ Gewebe} \times \text{min})$. Das Atemvolumen der hämoglobinfrei perfundierten, normalen Rattenleber beträgt nach Scholz (1967) $3.73 \times 10^{-2} (\text{cm}^3 O_2 / \text{cm}^3 \text{ Gewebe} \times \text{min})$. Diese Ergebnisse und der im histologischen Präparat der regenerierenden, isoliert perfundierten Rattenleber bestimmte O_2 -Diffusionsweg von 0.09 mm deuten an, daß der O_2 -Verbrauch der regenerierenden Leber fünf Stunden nach Absetzen des HU-Blockes (14. bis 30. h nach Teilhep., $2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$) gegenüber der unbehandelten, adulten Rattenleber erhöht ist.

6. Metabolite im Perfusat

6.1. Einleitung

Die Messung von Metaboliten im Perfusionsmedium während des Perfusions-experiments ist für die Kontrolle des funktionellen Zustandes und der Darstellung der physiologischen Stoffwechselwege der Leber unentbehrlich. Im folgenden Kapitel wird die Freisetzung von Metaboliten aus der Leber in das Perfusat dargestellt. Glucose, Lactat, Pyruvat, Acetoacetat, β -Hydroxy-Butyrat, Harnstoff und Ammoniak wurden enzymatisch bestimmt. Die Ergebnisse von Leberperfusionen nach Laparotomie, Zweidrittel-Hepatektomie und nach Kombination von Teilhepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung in vivo werden zum Vergleich gegenübergestellt.

6.2. Material und Methode

6.2.1. Tiermaterial, Operation und Leberperfusion

8 männliche Wistarratten im Gewicht von 181-193 g wurden für diese Versuche verwendet. Zweidrittel-Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung entsprachen den in den jeweiligen Kapiteln genannten Methoden (3.2.1. und 5.2.2.). Die Laparotomie wurde durch Eröffnung des Abdomens durch Median-schnitt und anschließendem Nahtverschluß durchgeführt. Die Perfusionstechnik wurde unter 2.4. beschrieben. Als Perfusionsmedium diente Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung (siehe 2.5.). Nach zweistündiger Perfusion wurde ein Perfusatwechsel durchgeführt.

6.2.2. Probeentnahme und Enteiweißung

1.0 ml des Perfusats wurde aus dem Sammelgefäß der Perfusions-Apparatur zu Beginn des Perfusionsexperiments und dann in 15minütigen Abständen entnommen.

Zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Metabolite wurde 1.0 ml Perfusat sofort nach Entnahme in vorbereitete Gläser mit 0.2 ml 2 M Perchlorsäure gegeben. Nach kurzzeitigem Zentrifugieren (2 Minuten) wurde 1.0 ml von diesem enteiweißten Extrakt zu 0.1 ml 1.65 M K_2CO_3 und 1.0 M Triäthanolamin (TRA) pipettiert. Abschließend erfolgte einminütiges Zentrifugieren.

6.2.3. Prinzip des optischen Tests nach Warburg

Die Bestimmung der Metabolite erfolgte nach der Methode des optischen Tests nach Warburg (1938). NADH und NADPH absorbieren Licht im nahen Ultraviolett (Maximum bei 340 nm), ihre oxidierten Partner hingegen nicht. Änderungen der Konzentration von NADH und NADPH während eines Reaktionsablaufs können aus der gemessenen Extinktion errechnet werden.

Im einfachen optischen Test sind an der Meßreaktion Pyridinnukleotide selbst beteiligt, im zusammengesetzten optischen Test sind sie indirekt über eine NAD abhängige Indikatorreaktion beteiligt. Aus der Extinktionsdifferenz läßt sich die Menge der zu messenden Substanz berechnen, sofern die Gleichgewichtskonstante die Endprodukte einer Seite stark begünstigt (z.B. bei der Pyruvatbestimmung). Bei ungünstiger Lage des Gleichgewichts

kann durch die Zugabe von Reagenzien, die das Endprodukt laufend aus dem Gleichgewicht entfernen, ein quantitativer Umsatz erreicht werden (z. B. bei der Lactatbestimmung).

6.2.4. Zusammensetzung der einzelnen Tests

6.2.4.1. Glucose-Bestimmung

Die Glucosebestimmung erfolgte mit der Hexokinase (HK) und Glucose-6-P-Dehydrogenase-Reaktion (G-6-P-DH) : Aus Glucose entsteht in Anwesenheit von ATP und Hexokinase, Glucose-6-Phosphat und ADP. Aus Glucose-6-P wird in einer Folgereaktion durch Zusatz von NADP^+ und G-6-P-DH, Gluconat-6-Phosphat und NADPH und H^+ . Die NADPH-Zunahme, gemessen an der Extinktionänderung bei 340 nm ist der Glucose-Menge proportional.

Zuerst werden 100 ml 0.1 M Triäthanolamin-Puffer hergestellt. Dazu werden 1.85 g Triäthanolamin-hydrochlorid in 50 ml H_2O gelöst, mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt und der pH mit NaOH auf 7.6 eingestellt. Hinzugegeben werden 60 mg NADP, 50 mg ATP, 200 mg MgCl_2 , 10 μl G-6-P-DH (Originallösung: 5 mg G-6-P-DH in 1 ml 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung, pH 6.0) und 40 μl HK (Originallösung: 10 mg HK in 1 ml 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung, pH = 6.0). Die Reaktionszeit beträgt 30 min, bei einem Probe-Puffer-Verhältnis von 200 zu 500 μl .

6.2.4.2. Pyruvat-Bestimmung

Pyruvat wird in Anwesenheit von NADH und der Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert. Die Extinktionsabnahme von NADH ist der Pyruvatkonzentration proportional.

Dem 0.1 M TRA-Puffer (100 ml) (Verhältnis Probe-Puffer : 200 zu 500 ml) werden bei pH 7.6 5 μ l Lactat-Dehydrogenase (5 mg LDH in 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung, pH 6.0) und 4 mg NADH / 10 ml bei $E_0 = 1000$ hinzugegeben.

6.2.4.3. Lactat-Bestimmung

Lactat wird durch Lactat-Dehydrogenase (LDH) und NAD zu Pyruvat oxidiert. Die NADH-Bildung, gemessen an der Extinktionszunahme ist Meßgröße.

Als Puffer dient eine Glycin (0.535 M)-Hydrazin (0.4 M)-Lösung. Dazu gegeben werden 100 mg NADH und 500 μ l LDH. Der pH wird auf 9.5 eingestellt. Dauer der Reaktion : 45 min.

6.2.4.4. Acetoacet - Bestimmung

Nach Zugabe von NADH und β -Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase (β -HBDH) entsteht aus Acetoacetat Hydroxy-Butyrat. Die Abnahme der Extinktion dient der Berechnung.

Im Testansatz sind 100 mM TRA (100 ml) auf pH 7.6 eingestellt. Dazu-
gefügt werden NADH (4 mg/10 ml) bei $E_0 = 1000$ und β -Hydroxy-Butyrat-
Dehydrogenase. In der Originallösung β -OH-Butyrat-DH sind 10 mg β -HBDH
in 2 ml 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung bei pH 6.0 gelöst. Davon werden
150 μ l entnommen. Die Reaktion läuft über einen Zeitraum von 30 min.

6.2.4.5. β -Hydroxy-Butyrat-Bestimmung

Der β -OH-Butyrat-Bestimmung liegt das gleiche Prinzip wie bei der Aceto-
acetat-Bestimmung zugrunde (siehe 6.2.4.4.).

Im Puffer (100 ml) sind 0.1 M Hydroxymethyl-Aminomethan (303 mg/25 ml)
und 0.4 M Hydrazinhydrat (0.5 ml/25 ml) bei pH 8.5 enthalten. Dazugegeben
werden 25 mg NAD und 125 μ l β -OH-Butyrat-DH. Es ist hierbei zu berück-
sichtigen, daß nur die L-Form dieses Enzyms reagiert. Da in der Original-
Lösung (Boehringer) D- und L-Form enthalten sind, werden die doppelten
Mengen entnommen.

6.2.4.6. Ammoniak- und Harnstoff-Bestimmung

Aus α -Ketoglutarat, NADH und NH_4^+ wird durch das Enzym Glutamat-
Dehydrogenase (Glu-DH) das α -Ketoglutarat reduktiv aminiert. Meß-
größe ist die NADH-Abnahme gemessen an der Extinktion bei 340 nm.

160 mM Tris-Puffer im pH 8.0 wird NADH (4 mg/10 ml bei $E_0 = 1000$), 42 mg
 α -Ketoglutarat, 60 mg Äthylendiamintetraacetat (EDTA), 72 mg ADP und
1 ml Glutamat-DH (Originallösung : 100 mg Glu-DH in 10 ml Glycin zu-

gesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 Minuten. Im Anschluß an die Ammoniak-Bestimmung wird in jede Probe 5 mg Urease/ml EDTA mit pH 6.5 hinzugegeben und die Proben noch einmal auf Harnstoff im Photometer gemessen.

6.3. Ergebnisse

6.3.1. Glucose-Freisetzung ins Perfusat

Lebern von Ratten, die zuvor laparotomiert, teilhepatektomiert oder teilhepatektomiert und 16 Stunden HU-dauerinfundiert wurden, schütten bei extrakorporaler Durchströmung Glucose aus. Nach 2stündiger Perfusion beträgt die im zirkulierenden Medium nachweisbare Menge von Glucose zwischen 28 und 46 μMol bezogen auf 1 Gramm Leber (Feuchtgewicht) (Abb. 9). Während die Lebern von laparotomierten und teilresezierten Ratten in annähernd gleichem Maße Glucose freisetzen, liegen die Werte des Experiments mit HU-dauerinfundierten Ratten um etwa 40 % unter den Werten der teilresezierten und 29 % unter den Messungen der laparotomierten Ratten.

Nach Erneuerung des Perfusionsmediums zwei Stunden nach Beginn der Perfusion wird wiederum Glucose in das Perfusat ausgeschüttet. Die Abgabe in das Medium ist jedoch während der auf den Perfusatwechsel folgenden Stunden im Vergleich zu den ersten beiden Stunden auf etwa ein Drittel vermindert.

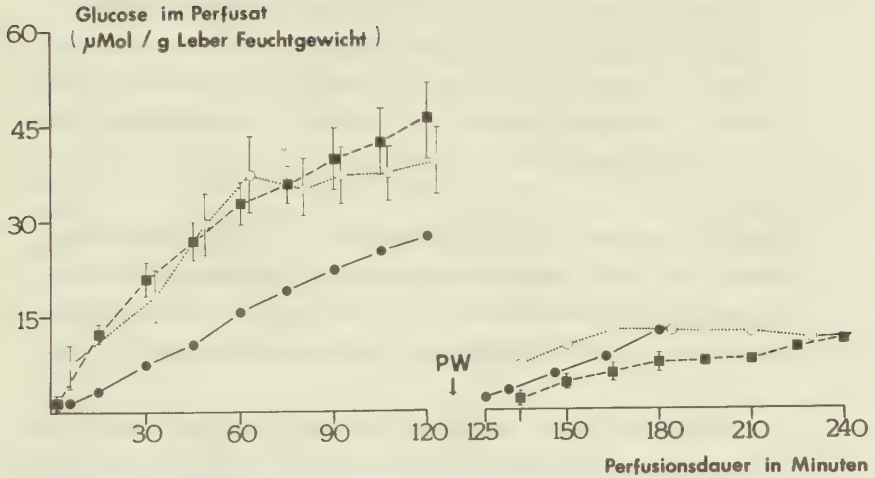


Abb. 9: Freisetzung von Glucose aus der Leber verschiedener Funktionszustände in das Perfusat in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten. Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler aus acht Versuchen. (PW = Perfusatwechsel)

($\square \cdots \square$) = Leberperfusion 22 Stunden nach partieller Hepatektomie
 $\circ \cdots \circ$ = Leberperfusion 22 - 26 Stunden nach Laparotomie
 $\bullet \cdots \bullet$ = Leberperfusion nach HU-Dauerbehandlung (14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie ($2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$))

6.3.2. Lactat- und Pyruvat-Freisetzung in das Perfusat

Die Lebern von laparotomierten und hepatektomierten (22 Stunden nach Teilresektion) Tieren zeigen ein ähnliches Ausschüttungsmuster von Lactat und Pyruvat. Nach 45-60 min Perfusion sind etwa $13 \mu\text{Mol}$ Lactat + Pyruvat / g Leber (Feuchtgewicht) im Medium nachzuweisen. In der folgenden Stunde werden die Glykolyse-Endprodukte zum Teil wieder aus dem Perfusat ins Lebergewebe aufgenommen (Tab. 18).

Dreißig Minuten nach Perfusatwechsel werden nur noch 4 % (teilresezierte Ratten) bzw. 25 % (laparotomierte Ratten) der Maximalmengen der ersten beiden Perfusionsstunden gefunden. Im weiteren Verlauf der Perfusion werden diese Mengen nahezu vollständig wieder von der Leber aufgenommen.

Das Verhältnis der freigesetzten Mengen von Lactat zu Pyruvat ist während der Durchströmung der Leber inkonstant. Das Verhältnis verändert sich bei Versuchen mit Lebern nach Teilresektion im Laufe der Perfusion zugunsten von Pyruvat. Umgekehrt lassen die Versuche mit Lebern nach Laparotomie der Tiere eine relative Zunahme des Lactats erkennen.

Beide Lebern streben nach Perfusatwechsel jedoch ein gleiches Verhältnis von Lactat zu Pyruvat im Medium an (Tab. 19).

Die Produktion von Lactat und Pyruvat in der perfundierten Leber, die von der 14. bis zur 30. Stunde nach partieller Resektion mit Hydroxyharnstoff dauerinfundiert wurde, liegt unter der Grenze der Nachweisbarkeit. Die Gültigkeit dieses Ergebnisses, das aus einem Experiment gewonnen wurde, deutet sich in einem zweiten 60-Minuten-Versuch an (HU von der 14.-22 Std nach Teilresektion).

Tab. 18: Lactat + Pyruvat- Ausschüttung in das Perfusat in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten (Leberperfusion 22 Stunden nach partieller Hepatektomie, Leberperfusion 22-26 Stunde nach Laparotomie, Leberperfusion nach HU-Dauerbehandlung (14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie , 2.5×10^{-3} Mol/kg/h).

Perfusions dauer (min)	Leber nach Laparotomie L+P (μ Mol/ g Leber) (n = 3)	Leber nach Teilresektion L+P (μ Mol/ g Leber) (n = 3)	Leber nach HU- Dauerbehandlung L+P (μ Mol/ g Leber) (n = 1)
0		0.3	0
15	1.86	5.76	0
30	6.36	10.44	0
45	12.84	12.90	0
60	13.50	12.66	0
75	12.48	11.16	0
90	12.06	8.70	0
105	11.04	8.04	0
120	11.04	6.72	0
Perfusatwechsel			
	(n=1)	(n=2)	(n=1)
125		0.48	0
135	1.92	0.48	0
150	3.42	0.42	0
165	2.58	0.12	0
180	1.74	0.06	0
195	0.84	0	
210	0.54	0	
225	0.30	0	
240	0.18	0	

Tab. 19 : Verhältnis der Lactat- zur Pyruvat-Ausschüttung in zeitlicher Abhängigkeit von der Dauer des Versuches und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten. Die Ergebnisse wurden an jeweils einem Experiment ermittelt und dargestellt.

Perfusionsdauer (min)	Leber nach Laparotomie (22-26 h) (L/P)	Leber nach Teilresektion (22. Std) (L/P)
0	-	-
15	3.7	26.5
30	-	22.5
45	4.2	29.0
60	5.3	20.5
75	6.4	19.5
90	7.6	18.0
105	8.4	17
120	7.4	13
Perfusatwechsel		
125	-	9
135	2.8	9
150	2.9	7
165	2.6	2
180	2.4	2
195	1.8	
210	1.6	
225	1.7	
240	0.6	

6.3.3. Harnstoff-Ausschüttung und Ammoniak-Abgabe in das Perfusat

Harnstoff, ein Endprodukt des Aminosäure-Katabolismus wird von allen Lebern der unterschiedlich vorbehandelten Ratten synthetisiert. Dabei schütten die Lebern in unterschiedlichem Maße Harnstoff aus. Im Gegensatz zu den Lebern nach Laparotomie ist eine Erhöhung der Produktion von Lebern nach Teilresektion um den Faktor 6 und von der Leber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung um den Faktor 11 nach zweistündiger Perfusion nachzuweisen. Diese Verhältnisse bleiben auch in den Lebern für 60 min nach Perfusatwechsel erhalten (Abb 10).

Die Mengen nachweisbaren Ammoniaks liegen entweder unter der Grenze der Bestimmungsmöglichkeit (laparotomierte Ratten) oder sind sehr gering (2.0 μMol bei teilresezierten Lebern, 0.3 μMol nach HU-Dauerbehandlung) (Tab. 20). Es ist damit gezeigt, daß das im Protein-Katabolismus entstandene NH_3 nahezu vollständig in einem zyklischen Prozeß in Harnstoff aufgenommen wird.

6.3.4. Ketogenese

Bei Fehlen von exogenen Substraten produzieren die perfundierten Lebern in unterschiedlichem Maße Ketonkörper. Die Produktion von $\beta\text{-OH-Butyrat}$ und Acetoacetat der Versuche mit Lebern nach Laparotomie und nach Teilresektion unterscheiden sich geringfügig (9.2 bzw. 11.0 $\mu\text{Mol/g}$ Leber Feuchtgewicht) (Abb. 11). Acetoacetat wird in diesen Lebern im Vergleich zu $\beta\text{-OH-Butyrat}$ vermehrt ausgeschüttet (Tab.21). Der Quotient dieser beiden Substanzen verringert sich im Verlauf der ersten beiden Perfusionsstunden (Tab.21).

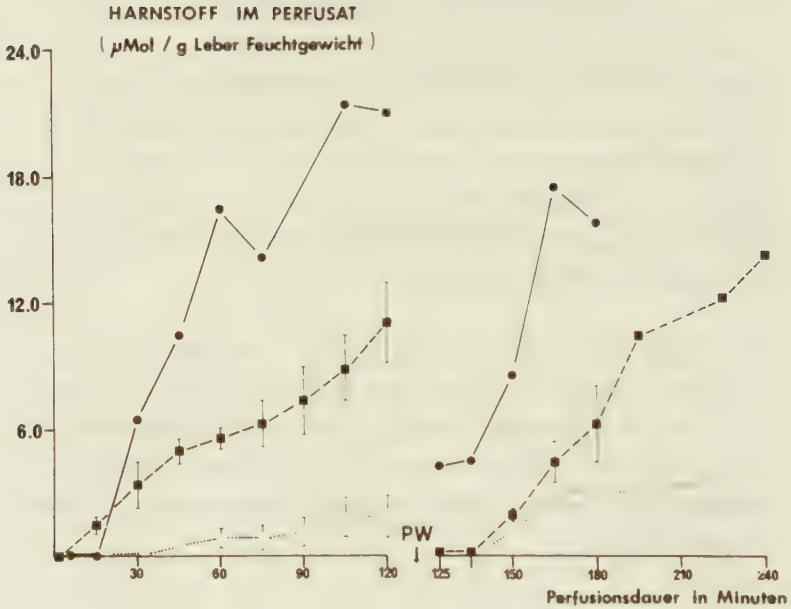


Abb. 10 : Harnstoff-Ausschüttung in das Perfusat in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratte, (Mittelwerte $\pm$ mittlere Fehler, PW = Perfusatwechsel)

- (■--■) = Leberperfusion 22 Stunden nach partieller Hep.
-○ = Leberperfusion 22-26 Stunden nach Laparotomie
- = Leberperfusion nach HU-Dauerbehandlung
(14.-30.Std nach partieller Hepatektomie
 $2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$)

Tab. 20 : Ammoniak-Abgabe in das Perfusat in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten (Leberperfusion 22 Stunden nach partieller Hepatektomie, Leberperfusion 22-26.Stunde nach Laparotomie, Leberperfusion nach HU-Dauerbehandlung (14.-30. Stunde nach partieller Hepatektomie, 2.5×10^{-3} Mol/kg/h)

Perfusions- dauer (min)	Leber nach Laparotomie NH ₃ -Abgabe (μ Mol/g Leber) (n = 3)	Leber nach Teilresektion NH ₃ -Abgabe (μ Mol/g Leber) (n = 3)	Leber nach HU-Dauerbehandlung NH ₃ -Abgabe (μ Mol/g Leber) (n = 1)
0		1.56	0.36
15	0	1.50	1.50
30	0	1.14	0.24
45	0	1.38	0.24
60	0	1.50	0.24
75	0	1.98	0.24
90	0	2.10	0.24
105	0	2.10	0.42
120	0	2.04	0.30
Perfusatwechsel			
	(n = 2)	(n = 1)	(n = 1)
125		2.22	0
135	0	3.42	0
150	0	3.06	0
165	0.06	2.70	0.12
180	0.84	2.52	0.12
195	0	1.74	
210	0	3.42	
225	0	4.20	
240	0	2.58	

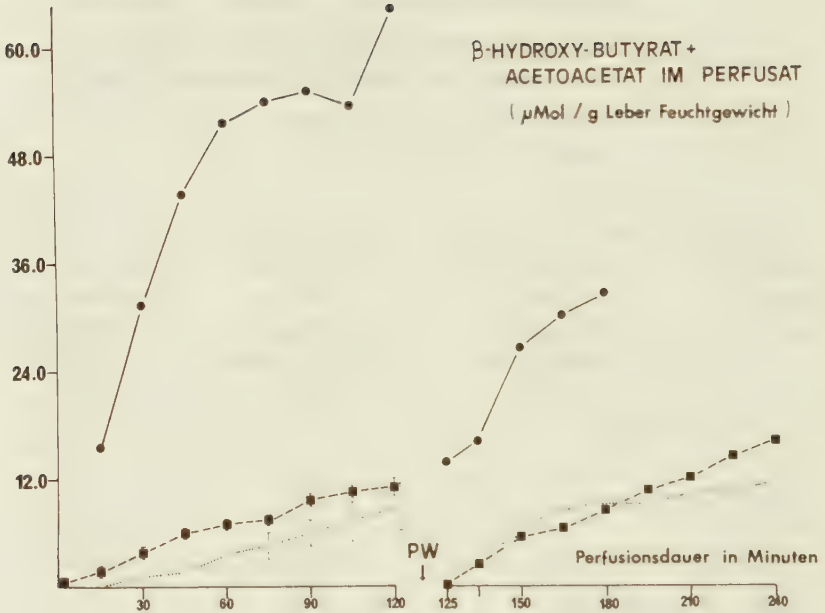


Abb. 11 : Ketonkörper im Perfusat in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung (Mittelwerte $\pm$ mittlere Fehler, PW = Perfusatwechsel)

- (■--■ = Leberperfusion 22 Stunden nach partieller Hep.
- o...o = Leberperfusion 22-26 Stunden nach Laparotomie
- = Leberperfusion nach HU-Dauerbehandlung (14.-30. Stunde nach partieller Hep., 2.5×10^{-3} Mol / kg / h)

Tab. 21 : Verhältnis der Hydroxy-Butyrat - zur Acetoacetat-Ausschüttung (B/A) in zeitlicher Abhängigkeit von der Versuchsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils an einem typischen Versuch ermittelt.

Perfusions- dauer (min)	Leber nach Laparotomie (22-26 h) (B/A)	Leber nach Teilresektion (22.Std) (B/A)	Leber nach HU-Dauerbehandlung (14.-30. Std.) (B/A)
15		0.34	0.41
30	0.71	0.40	0.77
45	0.30	0.28	1.09
60	0.29	0.22	1.28
75	0.27	0.19	1.42
90	0.23	0.13	1.43
105	0.23	0.11	1.35
120	0.19	0.07	1.82
Perfusatwechsel			
125			0.41
135	0.27	0.22	0.37
150	0.16	0.21	0.44
165	0.10	0.16	0.39
180	0.07	0.12	0.45
195	0.06	0.10	
210	0.05	0.07	
225	0.05	0.07	
240	0.05	0.07	

Die Leber der mit Hydroxyharnstoff vorbehandelten Ratte zeigt einen wesentlich erhöhten Fettsäure-Abbau ($64.4 \mu\text{Mol/g}$ Leber Feuchtgewicht nach zwei Stunden) (Abb. 11). Das Verhältnis von β -Hydroxy-Butyrat zu Acetoacetat im Perfusat liegt anfänglich (30 min) in der gleichen Größenordnung wie bei der Leber nach Teilresektion und Laparotomie. Nach Erreichen von gleichen Produktionsmengen von β -OH-Butyrat nach etwa 45 min nimmt der Quotient kontinuierlich zugunsten von β -OH-Butyrat zu und erreicht nach 120 Minuten einen Wert von 1.82. Nach Mediumwechsel ist der Quotient über den gemessenen Zeitraum konstant (Tab.21).

6.3.5. Änderungen im Redoxzustand der Leber

Für die Untersuchung zellulärer Funktionen in der Leberzelle ist der Redoxzustand der Leber ein wichtiger Parameter. Dabei sind die Metabolit-Paare Lactat/Pyruvat und β -OH-Butyrat/Acetoacetat von Bedeutung. Sie spiegeln die Redoxpotentiale intrazellulärer NADH/NAD-Systeme wider.

Das Redoxpotential des cytoplasmatischen NADH-NAD-Systems läßt sich in erster Näherung aus dem Quotienten Lactat zu Pyruvat (L/P) berechnen, während der Quotient β -OH-Butyrat/Acetoacetat (B/A) ein mitochondriales Redoxpotential wiedergibt. Zwischen den Substratpaaren und den entsprechenden zellulären NADH/NAD-Systemen besteht eine logarithmische Beziehung (d.h. das Redoxpotential : $E = E'_0 - 30.7 \log \text{Red/Ox}$). Deshalb wurden die Quotienten im log. Maßstab aufgetragen (Abb.12 und 13). Da die Normalpotentiale (E'_0) der intrazellulären Redoxsysteme unsicher sind, wurde auf Umrechnung in Redoxpotentialeinheiten (mVolt) verzichtet.

Abb. 12 gibt eine Zusammenfassung der cytoplasmatischen Redoxveränderungen, wie sie unter zwei verschiedenen metabolischen Zuständen der Leber (nach Teilresektion und Laparotomie) zu beobachten sind. In der logarithmischen Darstellung der Quotienten L/P zeigt die teilresezierte Leber einen kontinuierlichen Kurvenabfall über den Versuchszeitraum (4 Stunden) entsprechend einem veränderten Redoxpotential. Die Potentialverhältnisse sind während Leberperfusion nach Laparotomie entgegengerichtet : einem Anstieg der Kurve in den beiden ersten Stunden steht ein Abfall nach Mediumwechsel gegenüber.

Das Diagramm von Abb. 13 zeigt die logarithmische Darstellung der Verhältnisse von β -OH-Butyrat zu Acetoacetat. Darin lassen sich die Veränderungen der Redoxpotentiale des mitochondrialen Raumes beobachten. Die Kurven der Lebern nach Teilresektion und Laparotomie fallen vor und nach Perfusatwechsel linear ab, bis nach etwa dreieinhalb Stunden ein konstantes Redoxpotential erreicht wird. Dagegen besteht in der mit Hydroxyharnstoff vorbehandelten Leber eine regelmäßige Zunahme im logarithmischen Verhältnis der beiden Endprodukte des Fettsäureabbaus.

6.4. Diskussion

Die Metabolit-Bestimmung im Perfusat regenerierender Leber erfüllt eine zweifache Aufgabe : Zum einen ermöglicht sie Aussagen über den funktionellen Zustand der Leber, zum anderen lassen sich Stoffwechselwege aufzeigen. Beim Vergleich der perfundierten Lebern der unterschiedlich vorbehandelten Tiere (Laparotomie, Teilresektion, Teilresektion und HU-Dauerbehandlung)

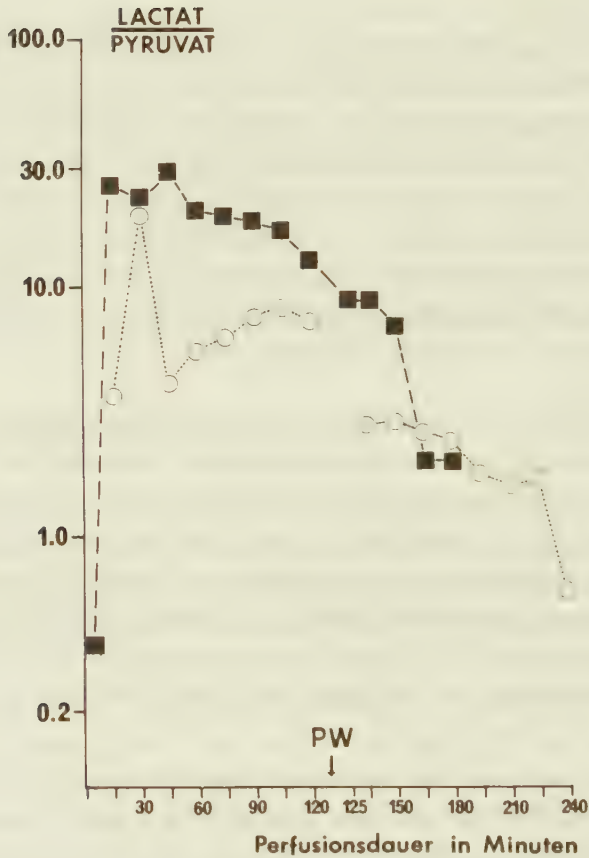


Abb. 12: Veränderungen des cytoplasmatischen Redoxzustandes in zeitlicher Abhängigkeit von der Perfusionsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten. Die Quotienten von Lactat zu Pyruvat sind im logarithmischen Maßstab dargestellt. Die Ergebnisse wurden an jeweils einem typischen Versuch ermittelt. (■--■ = Perfusion von der 22. Stunde nach partieller Hep. ab o.....o = Perfusion 22-26 Stunden nach Laparotomie)

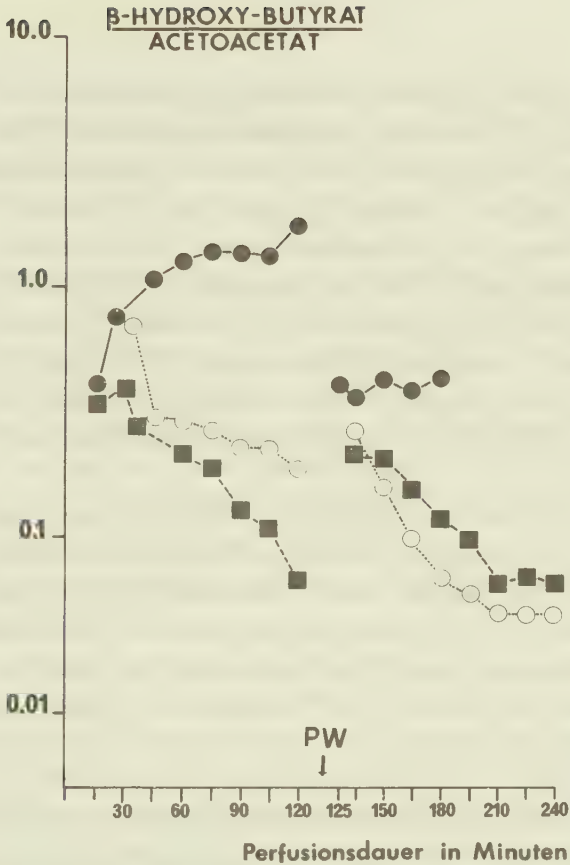


Abb. 13: Veränderungen des mitochondrialen Redoxsystems in zeitlicher Abhängigkeit von der Perfusionsdauer und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorbehandlung der Ratten. Die Quotienten von β -Hydroxy-Butyrat zu Acetoacetat sind im logarithmischen Maßstab dargestellt. Die Ergebnisse wurden an jeweils einem typischen Versuch ermittelt (PW = Perfusatwechsel)

- (■--■ = Perfusion 22 Stunden nach partieller Hepatektomie
-○ = Perfusion 22-26 Stunden nach Laparotomie
- = Perfusion nach HU-Dauerbehandlung (14.-30.Std)

(2.5×10^{-3} Mol/kg/h)

ergibt sich, daß in Bezug auf die Stoffwechsellaage der Lebern sich die Perfusionen nach Laparotomie und Teilresektion grundsätzlich von den Perfusionen HU-vorbehandelter Leber unterscheiden. Während die Ratten nach den operativen Eingriffen der Laparotomie und der Teilresektion kurze Zeit danach die Nahrungsaufnahme fortsetzen, nehmen die HU-vorbehandelten Lebern während des Infusionszeitraumes (16 Stunden) Nahrung in sehr geringen Mengen auf. Der metabolische Status dieser Tiere entspricht somit demjenigen von hungernden Tieren. Dagegen befinden sich die Lebern der teilresezierten und laparotomierten Ratten nur während der Dauer der Perfusion in einem hungerähnlichen Zustand.

Im Perfusat aus Krebs-Henseleit-Lösung und Albumin wird keine Glucose angeboten. Die perfundierte Leber schüttet Glucose aus. Dafür müssen Glykogenvorräte mobilisiert werden. Bemerkenswert ist, daß die Lebern der teilresezierten und laparotomierten Tiere in annähernd gleichem Maße Glucose produzieren, obwohl in der teilresezierten Leber in den Frühstadien nach dem operativen Eingriff histologisch kein Glykogen nachweisbar ist (Bucher 1963).

Lebern von Ratten, denen 24 Stunden die Nahrung entzogen war, sind im Perfusionsexperiment in der Lage, eine Gluconeogenese (z.B. aus Lactat oder Alanin) durchzuführen (Zimmer 1973). Entsprechend könnte eine Gluconeogenese aus endogenen Aminosäuren auch für die HU-vorbehandelte Leber angenommen werden. Obwohl diese zusätzliche Quelle für die Glucoseproduktion zur Verfügung steht, werden in der HU-vorbehandelten Leber die vergleichbaren Produktionsmengen der Lebern nach Laparotomie und Teilresektion nicht erreicht. Es deutet sich eine Erschöpfung bzw. eine verminderte Auffüllung der Glykogenvorräte an, die durch einen Verbrauch von Glucose während des mindestens 16stündigen Hungerzustands erklärt

werden kann. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß die Höhe der Glucosemenge im Perfusat nicht nur durch Ausschüttung dieser Substanz sondern auch durch Abstrom in den Embden-Meyerhof-Weg oder Reaktionen der mischfunktionellen Oxydase geregelt ist (Scholz et al. 1973).

In verschiedenen Untersuchungen sind die tageszeitlichen Schwankungen des Glykogen-Gehalts der Rattenleber beschrieben (Agren et al. 1931, Deuel et al. 1938, Leske 1963, v. Mayersbach 1967). Der Glykogen-gehalt der Leber zeigt ein Maximum zwischen 9 und 10 Uhr und ein Minimum zwischen 18 und 20 Uhr (v. Mayersbach 1967). Es wurde gefunden, daß im Perfusionsexperiment dieses Verhalten der Leber beibehalten wird (Scholz 1967). Durch einheitliche Durchführung der Perfusionsversuche an regenerierender Leber in den Vormittagsstunden (9 bis 12 Uhr Versuchs-Beginn) können mögliche Interferenzen mit tageszeitlichen Veränderungen ausgeschlossen werden.

Die aus Glykogen mobilisierte Glucose wird zu Lactat und Pyruvat abgebaut. Dies konnte in den Versuchen mit Lebern nach Laparotomie und nach Teil-resektion beobachtet werden (Tab. 18). Im Perfusat der mit Hydroxyharnstoff vorbehandelten Leber sind die Glykolyse-Endprodukte nicht nachzuweisen. Das Ausschüttungsmuster ähnelt hierbei den Ergebnissen von Perfusionen, die in den Nachmittagsstunden zwischen 14⁰⁰ und 17⁰⁰ durchgeführt werden (Scholz 1967). Es ist wahrscheinlich, daß in diesem Versuch auf Grund der besonderen Stoffwechsellage das aus der Glykolyse entstandene Pyruvat nicht zu Lactat reduziert, sondern unmittelbar zu Acetyl-CoA oxidiert wurde, um in den Krebs-Zyklus eingeschleust zu werden.

Kennzeichnend für den Hungerzustand sind die mit rascher Geschwindigkeit ablaufende Ketogenese und der Proteinkatabolismus (Abb. 10 und 11). Bei hungernden Tieren scheinen an diesen Vorgängen Membranstrukturen betroffen zu sein, die sich durch gesteigerte Permeabilität bzw. Fragilität auszeichnen (Scholz 1967).

Die in den Lebern nach Laparotomie und nach Zweidrittel-Hepatektomie im Perfusionsexperiment beobachtete Ketogenese und Harnstoff-Synthese sind durch den während der Perfusion induzierten Hungerzustand bedingt, da auf Zugabe von energiereichen Substraten in das Perfusat verzichtet wurde.

Der Nachweis der Glykolyse einerseits, sowie des Fettsäureabbaus und der Harnstoff-Synthese andererseits, lassen auf die Intaktheit dieser elementaren Prozesse im Zytoplasma bzw. innerhalb der Mitochondrien schließen.

Lactat- und β -OH-Butyrat-Bildung stellen Sackgassen des intermediären Stoffwechsels dar, da beide Produkte nur über die Umkehrung des letzten Schrittes ihrer Bildung weiter umgesetzt werden können (Scholz 1967). Durch ihre Verbindung mit dem NADH/NAD-System des jeweiligen Kompartiments übernehmen sie eine Pufferfunktion für den Wasserstoffdruck, der die geringe Kapazität der Pyridinnukleotide entlastet. Im stationären Zustand befinden sich die zellulären Konzentrationen dieser Substratpaare und die Konzentration des freien NADH und NAD im Gleichgewicht. Somit sind die Quotienten Lactat/Pyruvat und β -OH-Butyrat/Acetoacetat wegen ihrer besonderen Stellung im Stoffwechsel als Redoxindikatoren besonders geeignet (Scholz 1967).

Lebern der teilresezierten und der laparotomierten Ratten zeigen im Perfusionsexperiment im Vergleich des Wasserstoffdruckes ein gegensätzliches Verhalten im mitochondrialen und cytoplasmatischen Raum. Während in den Lebern nach Teilresektion der Wasserstoffdruck in beiden Systemen ansteigt, nimmt die Leber nach Laparotomie im Wasserstoffdruck des cytoplasmatischen Raums ab, im mitochondrialen zu. Ein Druckausgleich wie er nach den Ergebnissen der Leber nach Teilresektion zwischen beiden System zu vermuten wäre, ist nach Untersuchungen von Scholz (1967) unwahrscheinlich. Im mitochondrialen System steht einer Zunahme des Wasserstoffdruckes in den Lebern nach Teilresektion und nach Laparotomie eine Abnahme des Wasserstoffdruckes in der Hydroxyharnstoff vorbehandelten Leber gegenüber.

7. Zusammenfassende Diskussion

Für Studien der Wachstumsregulation ist die regenerierende Leber nach partieller Hepatektomie ein oft verwendetes Modell (Bucher 1967). Zu definierten Zeitpunkten nach Teilhepatektomie befinden sich die Hepatozyten, in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Leberläppchen, in unterschiedlicher Anzahl in den Zellklus-Kompartimenten (Rabes et al. 1976). Dabei ist der Einstrom von Zellen aus dem G_1 - in das S-Kompartiment von besonderer Bedeutung. Die Erforschung der zugrunde liegenden Prinzipien wird durch die Interferenzen der Leber mit den Erfordernissen des Gesamtorganismus erschwert. Voraussetzung für die Objektivierung der Regulationsmechanismen des Wachstums ist die Standardisierung des Versuchssystems. Für entsprechende Untersuchungen bietet sich das Perfusionssystem an, welche die funktionelle Abhängigkeit der Leber von ihrer Beeinflussung durch humorale Faktoren weitgehend vermindert.

Durch kurzzeitige Perfusion (30 min) ergeben sich Hinweise auf den Stoffwechselzustand in vivo, da die Stoffwechselaktivität der Hepatozyten für einen beschränkten Zeitraum in vitro persistiert (Wrba und Rabes 1961). Im Perfusionssystem konnte gezeigt werden, daß unter in vivo-Verhältnissen die ersten proliferierenden Hepatozyten 15.5 Stunden nach Teilhepatektomie nachweisbar sind (Abb. 3). Diese Ergebnisse sind nahezu identisch mit Untersuchungen unter in vivo-Verhältnissen (Grisham 1960, Stöcker 1966, Tuczek und Rabes 1973).

Die mehrstündige Perfusion erlaubt eine Aussage darüber, ob neben der Persistenz der in vivo bereits gestarteten DNA-Synthese Regulationsfaktoren am G_1 -S-

Übergang den Influx in die S-Phase im Perfusionssystem ermöglichen. Die erhaltenen Ergebnisse (Abb. 5 und Tabelle 2) deuten den Nicht-Übertritt von regenerierenden Hepatozyten unter den Bedingungen der Leberperfusion bei Durchströmung mit energiearmer Perfusionslösung. In weiteren Versuchen (siehe Ergebnisse Tab. 7 und 8) wurden der regenerierenden, isoliert perfundierten Leber im Perfusionsmedium verschiedene Substanzen angeboten. Die Gesamtheit der Ergebnisse läßt erkennen, daß ein oder mehrere Faktoren fehlen oder dahingehend verändert sind, so daß unter Perfusionsbedingungen der Einstrom von Hepatozyten in das S-Kompartiment nicht gelingt. Befunde von Untersuchungen über Veränderungen der Radioaktivität im Perfusionsmedium (Kapitel 4), die eine Abgabe von radioaktiven Verbindungen aus der vormarkierten Leber in das Perfusat (4.4.3. und 4.4.4.) zeigen und die nicht bekannten Größen der DNA-Vorläufer-Pools unter den veränderten Bedingungen der Perfusion, lassen noch keine endgültige Aussage über Prozesse eines G_1 -S-Influx von regenerierenden Hepatozyten zu.

Durch das Pharmakon Hydroxyharnstoff gelingt es, die Größe der Zellzyklus-Kompartimente zugunsten der G_1 -Phase zu beeinflussen. Diese Wirkung wird durch Hemmung des Enzyms Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase (Young und Hodas 1964, Young et al. 1967, Krakoff et al. 1968, Bacchetti und Whitmore 1969, Moore 1969), das im Grenzbereich des G_1 -S-Übergangs auf die Poolgröße der DNA-Synthese-Vorläufer wirkt (Walters et al. 1973, Plagemann und Erbe 1974), erzielt. Die Hemmwirkung auf die DNA-Synthese konnte auch unter Perfusionsbedingungen nachgewiesen werden (Tab. 17).

Nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung in vivo von der 14. bis zur 30. Stunde nach Teilhepatektomie (Dosis : 2.5×10^{-3} Mol/kg/h) besteht

zwischen der Größe des S-Kompartiments, gemessen an der Zahl $^3\text{H-TdR}$ -markierter Hepatozyten und der $^3\text{H-TdR}$ -Inkorporation in das säureunlösliche HClO_4 -Präzipitat und der Perfusionsdauer eine direkte Proportion bis zur 5. Perfusionsstunde nach Absetzen des HU-Blockes. Danach haben die Hepatozyten die Bildung der DNA nahezu vollständig bis zur 7. Perfusionsstunde abgeschlossen (Abb. 6). Gegenüber den in vivo-Verhältnissen in denen die Dauer der S-Phase mit etwa 7.5 Stunden bestimmt wurde (Rabes et al. 1976), wird die Dauer der S-Phase nach HU-Dauerbehandlung in vivo (14.-30. Stunde nach Teilhepatektomie, $2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$) auf etwa 6.5 Stunden verkürzt (Abb. 6).

Im Gegensatz zu dem gehemmten Influx der regenerierenden Hepatozyten in die DNA-Synthese-Phase scheint der Efflux der Zellen aus dem S-Kompartiment intakt zu sein.

Der Befund des niederen Markierungsindex (0.3 %) zur 7. Perfusionsstunde nach Absetzen der HU-Dauerbehandlung unterscheidet sich von in vivo-Ergebnissen in denen gefunden wurde, daß auch zu diesem Zeitpunkt (37. Stunde nach partieller Hepatketomie, d.e. der 7. Stunde nach Absetzen der HU-Dauerinfusion) Zellen mit der Bildung der DNA beginnen (Rabes et al. 1976). Somit spricht auch dieses Ergebnis gegen einen Übertritt von Hepatozyten in die S-Phase im Perfusionsexperiment.

Grundsätzlich davon verschieden sind die Verhältnisse zu Beginn der Perfusion nach Absetzen des HU-Blockes. Die markante Zunahme des $^3\text{H-TdR}$ -Markierungsindex deutet auf ein beträchtliches Maß von in das S-Kompartiment einströmenden Hepatozyten hin (Abb. 6). Als Ursache dieses angedeuteten

Influx von Hepatozyten in das S-Kompartiment ist die einheitliche Zellzyklus-Kompartimentierung an der G_1 -S-Grenze zu diskutieren. Dadurch könnte sich die intrazelluläre Konzentration von Substanzen in einem Maß erhöhen, wodurch ein Influx von Leberzellen in die DNA-Synthese-Phase ermöglicht wird. In Untersuchungen an Chinese hamster cells (Walters et al. 1976) wurde gefunden, daß die Erhöhung der spezifischen Aktivität der exogen angebotenen, radioaktiven DNA-Precursoren zur Markierung von proliferierenden Zellen auch während der HU-Applikation führt. Die Anwendbarkeit dieser Ergebnisse auf den proliferierenden Hepatozyten steht zur Zeit noch aus und erschwert dadurch die Aussage über den Influx von regenerierenden Hepatozyten in das S-Kompartiment.

Mit Hilfe der Metabolit-Bestimmung im Perfusat konnte gezeigt werden, daß die teilresezierte und die teilresezierte und Hydroxyharnstoff-vorbehandelte Leber (14. bis 30. Stunde nach Teilresektion) das Perfusat modifiziert, um annähernd physiologische Verhältnisse zu erreichen. Wesentliche Unterschiede in der Konzentration der enzymatisch bestimmten Substanzen (Glucose, Glykolyse-Endprodukte, Ketonkörper, Harnstoff und Ammoniak) sind auf den unterschiedlichen funktionellen Status der Ratten infolge der unterschiedlichen Vorbehandlung zurückzuführen.

8. Zusammenfassung

Spezifische Aspekte der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber wurden unter den Bedingungen der hämoglobinfreien Perfusion untersucht. Das System bietet standardisierbare Versuchsbedingungen durch Ausschaltung von modifizierenden Faktoren des Gesamtorganismus.

In Äthernarkose wurde an männlichen, adulten Wistarratten eine Teilhepatektomie nach Higgins und Anderson (1931) durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten nach dem operativen Eingriff wurden die Lebern isoliert und nach Kanülieren der Pfortader und unteren Hohlvene in ein Perfusionssystem übernommen. Als Perfusionslösungen wurden Medien unterschiedlicher Zusammensetzung gewählt (Krebs-Henseleit-Lösung mit (und ohne) Albuminzusatz (Endkonzentration von 4 g%), Anreicherung dieser Elektrolyt-Lösung mit Ham F-10 oder TCM 199, kontinuierliche Zufuhr von Insulin in das Perfusat (60 mE/h)). Die DNA-synthetisierenden Hepatozyten wurden im Perfusionssystem durch Zugabe von ^3H -Thymidin in das Perfusat (200 $\mu\text{Ci}/60\text{ ml}$) markiert. Zum Teil wurden die perfundierten Lebern in vivo vormarkiert (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{g KG}$ ^{14}C -Thymidin oder 0.8 $\mu\text{Ci}/\text{g KG}$ ^3H -Thymidin). Als Meßgröße der Inkorporation von markiertem Thymidin in die DNA dienten der Markierungsindex und die Radioaktivität im säureunlöslichen HClO_4 -Präzipitat. Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung (1.25 oder $2.5 \times 10^{-3} \text{ Mol/kg/h}$) wurde von der 14. Stunde bis zur 20.5 oder 30.0 Stunde nach Teilhepatektomie durchgeführt. Die Metabolite im Perfusat (Glucose, Lactat, Pyruvat, Acetoacetat, β -Hydroxy-Butyrat, Harnstoff und Ammoniak) wurden enzymatisch bestimmt.

Folgende Befunde wurden an der isolierten, regenerierenden Rattenleber unter den Bedingungen der hämoglobinfreien Perfusion erhoben :

1. Der adulte Hepatozyt ist auch im Perfusionssystem zur Synthese der Desoxyribonukleinsäure befähigt, wenn dieser Prozeß in vivo bereits begonnen worden ist.
2. Ein Anstieg des ^3H -TdR-Markierungsindex ist von der 15.5 Stunde nach partieller Hepatektomie an nachweisbar. Der Einbau von ^3H -TdR in die säureunlösliche, hochmolekulare Fraktion von Leberhomogenat beginnt zwischen der 14. und 15. Stunde nach Zweidrittel-Resektion.
3. Ein Influx von Parenchymzellen aus der G_1 -Phase in die S-Phase findet weder bei Verwendung von chemisch definierten Elektrolyt-Lösungen unter Zusatz von Albumin als Perfusat noch nach Angebot von hochwertigen Perfusionsmedien (Anreicherung der Elektrolyt-Lösung mit Ham F-10 und TCM 199) und Insulin statt.
4. Mit Hydroxyharnstoff ist in vivo der Beginn der DNA-Synthese zu hemmen. Nach Absetzen des HU-Blockes wird in vivo die DNA-Synthese durchgeführt. Die Reversibilität der Hemmung der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff bleibt im Perfusionssystem erhalten.
5. Zwischen der Hydroxyharnstoff-Infusionsdauer und dem Synchronisationsgrad der Hepatozyten läßt sich eine direkte Beziehung nachweisen.
6. Während kurzzeitiger Perfusion (30 min) sind die Prozesse, die zur Durchführung der DNA-Synthese notwendig sind, durch Zugabe von

Hydroxyharnstoff zum Perfusat (1.25 und 2.5×10^{-3} Mol/kg/h) hemmbar. Diese Hemmwirkung ist bereits 60 min nach Zusatz von Hydroxyharnstoff infolge des schnellen Abbaus in der Leber aufgehoben.

8. Im Gegensatz zu einer DNA-Synthese-Dauer von 7.5 Stunden in vivo, beträgt die Dauer der S-Phase im Perfusionssystem nach Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion (sechzehn Stunden mit der Dosis 2.5×10^{-3} Mol/kg/h) etwa 6.5 Stunden.
9. Sauerstoff ist für die Durchführung der DNA-Synthese ein entscheidender Faktor. Verminderte Sauerstoffzufuhr über die Blutwege führt zum Ausbleiben der DNA-Synthese in der Leber. Randbereiche der perfundierten Leber, in die der Sauerstoff entsprechend dem Partialdruck der Außenluft diffundieren kann, setzen die DNA-Synthese ungehindert fort. Die Breite dieses vitalen Randsaumes beträgt $90 \mu\text{m}$.
10. Zu definierten Zeitpunkten nach Zweidrittel-Resektion zeigt die regenerierende Rattenleber eine charakteristische Verteilung der markierten Zellen im Leberläppchen. Dieses Inkorporationsmuster ist unter Perfusions-Bedingungen mit den in vivo gefundenen Ergebnissen identisch.
11. Die regenerierende Rattenleber setzt Glucose, Lactat, Pyruvat, Harnstoff und Ketonkörper in das Perfusat frei. Eine Ausnahme stellt die Hydroxyharnstoff-vorbehandelte Leber dar, in deren Perfusat sich die Endprodukte der Glykolyse nicht nachweisen lassen. Bei ihr findet sich eine verstärkte Ketogenese und Harnstoffsynthese. Die elementaren Zellfunktionen persistieren unter Perfusionsbedingungen. Dreißig Minuten nach Zugabe von $200 \mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$ (spezifische Aktivität 5 Ci/mM) zu 60 ml Perfusat ist die nachweisbare Radioaktivität im Perfusat nur geringfügig abgesunken, doch liegt sie nicht

mehr in der Form des spezifischen DNA-Synthese-Vorläufers Thymidin vor. Radioaktive Abbauprodukte werden während der Perfusion kontinuierlich in das Perfusat freigesetzt.

Das System der hämoglobinfrei perfundierten, regenerierenden Rattenleber eröffnet nach den vorliegenden Ergebnissen eine Reihe neuer Möglichkeiten : Unter Standardbedingungen kann eine Analyse der extrazellulären, am G_1 -S-Übergang beteiligten Faktoren durchgeführt werden, wobei die komplexen Wechselwirkungen des Gesamtorganismus nicht modifizierend auf die Ergebnisse einwirken. Die Verwendung der Hydroxyharnstoff-synchronisierten, regenerierenden Leber bietet die Möglichkeit für die Untersuchung zelleigener, für den G_1 -S-Übergang entscheidender Faktoren. Das System der synchron DNA-synthetisierenden Hepatozyten im Organverband bei orthologer vaskulärer Zirkulation eignet sich durch die einheitliche Zellzyklus-Kompartimentierung als Modellobjekt zur Erforschung Zellzyklusphasen-spezifischer Reaktionen in einem hochdifferenzierten Organ in vitro.

9. Literaturverzeichnis

Adegoke, J.A. and Taylor, J.H.

Sequence Programming of DNA Replication over the S Phase in Chinese Hamster Cells

Exp. Cell Res. 104, (1977), 47-54

Agren, G. , Wilander, O. and Jorpes, E.

Cyclic Changes in the Glycogen Content of the Liver and Muscles of Rats and Mice

Biochem. J. 25, (1931), 777

Alpen, E.L., Johnston, M.E.

DNA-Synthetic Rate and DNA-Content of Nucleated Erythroid Cells

Exp. Cell Res. 47, (1967), 177-192

Bacchetti, S. and Whitmore, G.F.

The Action of Hydroxyurea on Mouse L-Cells

Cell Tissue Kinet., 2, (1969), 193-211

Barcroft, J.

The Gaseous Metabolism of the Liver. Part I : In Fasting und Late Digestion

J. Physiol. 45, (1912), 296

Becker, F.F.

Humoral Aspects of Liver Regeneration

in : Humoral Control of Growth and Differentiation, edited LoBue and Albert

S. Gordon, Vol.I : Academic Press , (1972), 249

Bhuyan, B.K., Fraser, T.J., Gray, L.G., Kuentzel, S.L., and Neil, G.L.
Cell-Kill Kinetics of Several S-Phase-Specific Drugs.
Cancer Res., 33, (1973), 888-894

Boden G. and Willms B.
Einfluß von Insulin auf Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel der perfundierten
Leber bei normalen und Alloxan-diabetischen Ratten.
Klin. Wochenschr. 44, (1966), 579

Bollum, F.J. and V.R. Potter
Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver. VI. Soluble Enzymes
Which Convert Thymidine to Thymidine Phosphates and DNA
Cancer Res. 19, (1959), 561-565

Brauer, R.W., Pesotti, R.L., Pizzolato, P.
Isolated Rat Liver Preparation. Bile Production and Other Basic Properties
Proc. Soc. exp. Biol., 78, (1951), 174

Braun, W.
Bestimmung der Geschwindigkeit der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion in der
perfundierten Rattenleber
Inaugural-Dissertation, München 1977

Bresnick, E.
Regenerating Liver : An Experimental Model for the Study of Growth. Methods
Cancer Res. 6, (1971), 347-397

Bryant, B.I.
Reutilization of Leucocyte DNA by Cells of Regenerating Liver
Exp. Cell Res. 27, (1962), 70-79

Bryant, B. J.

In Vivo Reutilization of the DNA-Thymidine of Necrotized Liver Cells by Cells of Testis and Intestine.

Exp. Cell Res. 32, (1963), 209-212

Bryant, B. J.

The Delayed Uptake of H-3-Thymidine by Ehrlich Ascites Tumor Cells

Exp. Cell Res., 37, (1965), 490-494

Bucher, N.L.R.

Regeneration of Mammalian Liver

Int. Rev. Cytol. 15, (1963), 245-300

Bucher, N.L.R.

Experimental Aspects of Hepatic Regeneration

New Eng. J. Med. 277, (1967), 738-746

Bucher, N.L.R. and Swaffield, M.N.

Regulation of Hepatic Regeneration in Rats by Synergistic Action of Insulin and Glucagon

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, No.3, (1975), 1157-1160

Butler, J.A.V. and P. Cohn

Studies on Histones, 6. Observations on the Biosynthesis of Histones and Other Proteins in Regenerating Liver.

Biochem. J. 87, (1963), 336-342

Canzanelli, A., Guild, R., and D. Rapport

Pituitary and Adreno-Cortical Relationship to Liver Regeneration and Nucleic Acids
Endocrinology 45, (1949), 91-95

Chang, L.O., and Looney, W.B.

A Biochemical and Autoradiographic Study of the in Vivo Utilization of Tritiated Thymidine in Regenerating Rat Liver.

Cancer Res. 25, (1965), 1817-1822

Cleaver, J.E. and R.M. Holford

Investigations into the Incorporation of H-3-Thymidine into DNA in L-Strain Cells and the Formation of a Pool of Phosphorylated Derivates During Pulse Labelling
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 103, (1965), 654-671

Colvin, M., and Bono, V.H.

The Enzymatic Reduction of Hydroxyurea to Urea by Mouse Liver

Cancer Res., 30, (1970), 1516-1519

Corey, E.L., and Britton, S.W.

Glykogen Levels in the Isolated Liver Perfused with Cortico-Adrenal Extract, Insulin and Other Preparations

Amer. J. Physiol. 131, (1941) 783

Dethlefsen, L.A., and Riley, R.M.

Hydroxyurea Effects in the C3H Mouse . I. Duodenal Crypt Cell Kinetics
Cell Tissue Kinet., 6, (1973), 3-16

Deuel, H.J., Butts, J.S., Hallman, L.F., Murray, S. and Blunden, H.

Studies in ketosis : XIII. Diurnal changes in liver glykogen

J. Biol. Chem., 123, (1938), 257

Diderholm, H., K.E. Fichtelius, and O. Linder

Availability Time of 3-H-Label After Administration of 3-H-Thymidine in Vivo
Exp. Cell Res. 27, (1962), 431-435

Edwards, J.L., and A. Koch

Parenchymal and Littoral Cell Proliferation During Liver Regeneration
Lab. Invest. 13, (1964), 32-43

Embsen, G. und Glaessner, K.

Beiträge z. Chem. Physiol. u. Path.
1, (1902), 313

Fabricius, E., and Rajewsky, M.F.

Determination of Hydroxyurea in Mammalian Tissues and Blood
Europ. J. Clin. Biol. Res., 16, (1971), 679-683

Fabrikant, J. I.

The Kinetics of Cellular Proliferation in Regenerating Liver
J. Cell Biol., 36, (1968), 551-565

Fabrikant, J. I.

Size of Proliferating Pools in Regenerating Liver
Exp. Cell Res. 55, (1969), 277-279

Feinendegen, L.E., Bond, V. P., and Hughes, W.L.

Physiological Thymidine Reutilization in Rat Bone Marrow
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, (1966), 448-455

Ferdinandus, J.A., H. P. Morris, G. Weber

Behavior of Opposing Pathways of Thymidine Utilization in Differentiating,
Regenerating and Neoplastic Liver
Cancer Res. 31, (1971), 550-556

Fichtelius, K.E., O. Groth

Re-utilization of Deoxyribonucleic Acid From Cells Other Than Leucocytes.
Nature 200, (1963), 587-588

Fink, K., R.E. Cline, R.B. Henderson, and R.M. Fink

Metabolism of Thymidine by Rat in Vivo
J. biol. Chem. 218, (1956), 1-14

Fischer, A., Takacs, L., und Molnar, G.

Parallele Bestimmung des arteriellen und portalen Kreislaufs der Leber
Acta Med. Acad. Sci. Hung., 12, (1958), 255

Fischer, A., Molnar, G., und Takacs, L.

Kreislauf und O_2 -Verbrauch der Leber bei experimenteller Zirrhose
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 17, (1961), 33

Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. and Fisher, E.R.

A Portal Blood Factor as the Humoral Agent in Liver Regeneration
Science, N.Y. , 171, (1971), 575-577

Förster, H. und Mehnert, H.

Kohlenhydratstoffwechsel in : Klinische Pathophysiologie
herausgegeben von W. Siegenthaler, Stuttgart 1973

Gerber, G. B. und J. Remy-Defraigne

Synthese der Desoxyribonucleinsäure in der isolierten, perfundierten Rattenleber
Z. Naturforschung, 18 b, (1963), 216-218

Gerber, G.B.

Synthesis of Nucleic Acids and Nuclear Proteins in Isolated Perfused Rat Liver
in : Isolated Liver Perfusion and its Applications, Raven Press, New York 1973

Goebell, H.

Standardisierte Methodik von extrakorporal perfundierten Rattenlebern und deren
Funktionstüchtigkeit

Diss. Med. Fak., Marburg/L. 1959

Grisham, J.W.

Deoxyribose Nucleic Acid Synthesis and Cell Renewal in Regenerating Rat Liver
J. Histochem. Cytochem. 8, (1960), 330

Grisham, J. W.

A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation
in Regenerating Rat Liver, Autoradiography with Thymidine-H-3.

Cancer Res. 22, (1962), 842-849

Grisham, J. W., Leong, G.F., Albright, N.L. and Emerson, J.D.

Effect of Exchange Transfusion on Labeling of Nuclei with Thymidine-³H and on
Mitosis in Hepatocytes of Normal and Regenerating Rat Liver

Cancer Res. , 26, (1966), 1472

Grisham, J.W.

Cellular Proliferation in the Liver.

in : Normal and Malignant Cell Growth, ed: Fry, R.J.M., Griem, M.L., and Kirsten W.H., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1969), 28 - 43

Harkness, R.D.

The Spatial Distribution of Dividing Cells of the Rat After Partial Hepatectomy
J. Physiol. 116, (1952), 373-379

Harkness, R. D.

Regeneration of the Liver

Brit. Med. Bull. 13, (1957), 87-93

Hemingway, J.T., Cater, D.B.

Effects of Pituitary Hormones and Cortisone Upon Liver Regeneration in the Hypophysectomized Rat

Nature (Lond.) 181, (1958), 1065-1066

Higgins, G.M., and Anderson, R.M.

Experimental Pathology of the Liver, Restoration of the Liver of the White Rat Following Partial Surgical Removal

Arch. Paht. 12, (1931), 186-202

Howard, A., and Pelc, S.R.

Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage

Heredity, Suppl.6, (1953), 261-273

Iseler, G.

Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung

Inaugural-Dissertation, München 1977

Johnson, T.C., and J.J. Holland

Ribonucleic Acid and Protein Synthesis in Mitotic HeLa Cells

J. Cell Biol. 27, (1965), 565

Kim, J.H., Gelbard, A.S., and Perez, A.G.

Action of Hydroxyurea on the Nucleic Acid Metabolism and Viability of HeLa Cells

Cancer Res., 27, (1967), 1301-1305

Kornberg, A.

Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid

Science 131, (1960), 1503-1508

Krakoff, I.H., Brown, N.C., and Reichard, P.

Inhibition of Ribonucleoside Diphosphate Reduktase by Hydroxyurea

Cancer Res., 38, (1968), 1559-1565

Krebs, H.A., and Henseleit, H.

Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper

Z. Physiol. Chem. 210, (1932), 33

LaBreque, D.R., and L.A. Pesch

Preparation and Partial Charakterisation of Hepatic Stimulator Substance (SS) from Rat Liver

J. Physiol. 248, (1975), 273-284

Lang, W., D.Müller, and W. Maurer

Prozentuale Beteiligung von exogenem Thymidin an der Synthese von DNS-
Thymidin in verschiedenen Geweben der Maus und in HeLa-Zellen
Exp. Cell Res. 49, (1968), 558-571

Leffert, H.L.

Growth Control of Differentiated Fetal Rat Hepatocytes in Primary Monolayer Cultur
VII. Hormonal Control of DNA Synthesis and its Possible Significance to the Problem
of Liver Regeneration

The Journal of Cell Biol., 62, (1974), 792-801

Leffert, H., N.M. Alexander, G. Faloona, B.Rubalcava and R. Unger
Specific Endocrine and Hormonal Receptor Changes Associated with Liver
Regeneration in Adult Rats.

Proc.Nat. Acad. Sci. USA, 72, No. 10, (1975), 4033-4036

Leong, G.F., Grisham, J.W., Hole, B.V. and Albright, M.L.

Effect of Partial Hepatectomy on DNA Synthesis and Mitosis in Heterotopic
Partial Autografts of Rat Liver

Cancer Res. 24,(1964), 1496

Leske, R.

Tagescyclen der Assimilation und Dissimilation des Leberglykogens.

Excerpta med. 70, (1963), 103

Loewenstein, W.R. and Penn R.D.

Intercellular Communication and Tissue Growth

J.Cell Biol. 33, (1967), 235

Looney, W.B.

The Replication of Deoxyribonucleic Acid in Hepatocytes

Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.) 46, (1960), 690-708

Looney, W.B., Chang, L.O., Banghart, F.W.

The Rate of DNA-Replication at the Molecular, Chromosomal, Cellular, and Intracellular Levels in Regenerating Rat Liver

Proc. nat. Acad. Sci. 57, (1967), 972-978

Malkinson, F.D., Griem, M.L., and Marianovic, R.

Effects of Hydroxyurea and Radiation on Hair Matrix Cells

Cell Tissue Kinet., 6, (1973), 395-405

v. Mayersbach, H.

Seasonal Influences on Biological Rhythms of Standardized Laboratory Animals

in : The Cellular Aspects of Biorhythms, ed.H.v.Mayersbach, Berlin, Springer (1967)

Mayfield, J.E. and J. Bonner

A Partial Sequence of Nuclear Events in Ragenerating Rat Liver

Proc. Nat. Acad.Sci. USA. 69, (1972), No.1, 7-10

Mendelsohn, M.L.

Autradiographic Analysis of Cell Proliferation in Spontaneous Breast Cancer of

C₃H Mouse. II. Growth and Survival of Cells Labeled with Thymidine

J. nat. Cancer Inst., 25, (1960), 485-500

Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Bale, W.B.

The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis. A Direct Study of the Isolated Perfused Rat Liver with the Aid of Lysine-e-¹⁴C

J. exp. Med. 94, (1951), 431

Moolten, F.L. and Bucher, N.L.R.

Regeneration of Rat Liver : Transfer of Humoral Agent by Cross Circulation
Science, 158, (1967), 272

Moore, E.C.

The Effects of Ferrous Ion and Dithioerythritol on Inhibition by Hydroxyurea of
Ribonucleotide Reduktase
Cancer Res. 29, (1969), 291-295

Morgan, E.H., and C. J. Brackenridge

Serum Protein Changes and Plasma Total Iron Binding Capacity After Laparotomy
or Partial Hepatectomy and in Anaemia in the Albino Rat
Quart. J. Exp. Physiol. 47, (1962), 66-73

Morley, C.G.D., S.Kuku, A.H. Rubenstein, J.L. Boyer

Serum Hormone Levels Following Partial Hepatectomy in the Rat
Biochemical and Biophysical Res. Communications, 67, No.2 (1975), 653-661

Neubert, D., H. Helge und R. Bass

Einbau von Thymidin in die Deoxyribonucleinsäure von Mitochondrien.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak., 252, (1965), 258-268

Oehlert, W., Hämmerling, W. und Büchner, F.

Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonucleinsäure-Synthese in
der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie
Beitr. path. Anat. 126, (1962), 91-112

Orloff, M.J., Lee, S., Charters, A.C., Chandler, J.G., Sgro, J.C.,
Grambort, D.E., and Broelsch, C.E.

Site of Origin of the Hepatotrophic Portal Blood Factor Responsible for Liver
Regeneration

Gastroenterol. 65, (1974), 755

Patt, H.M. and Quastler, H.

Radiation Effects on Cell Renewal and Related Systems

Physiol. Rev. 43, (1967), 357

Painter, R.B., Schaefer, A. W.

Variation in the Rate of DNA Chain Growth Through the S-Phase in HeLa Cells

J. Molec. Biol. 58, (1971), 289-295

Pelc, S. R. and Appleton, T.C.

Distribution of Tritiated Thymidine in Various Tissues

Nature 205, (1965), 1287-1289

Pfeiffer, S.E., and Tolmach, L.J.

Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea

Cancer Res. 27, (1967), 124-129

Philips, F.S., Sternberg, S.S., Schwartz, H.S., Cronin, A.P., Sodergren, J.E.,
and Vidal, P.M.

Hydroxyurea. I. Acute Cell Death in Proliferating Tissues in Rats

Cancer Res., 27, (1967), 61-74

Pilgrim, Ch. and Maurer, W.

Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten
von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymin

Naturwiss. 49, (1962), 544-545

Plagemann, P.G.W., and Erbe, J.

Intracellular Conversions of Deoxyribonucleosides by Novikoff Rat Hepatoma Cells and Effects of Hydroxyurea

J. Cellul. Physiol. 83, (1974), 321-336

Prescott, D.M.

The Synthesis of Total Macronuclear Protein, Histone, and DNA During the Cell Cycle in Euplotes Erythromus

J. Cell Biol., 31, (1966), 1-9

Price, J.B., Jr., Takeshige, K., Max, M.H. and Voorhees, A.S., Jr.

Factors of Portal Origin in Hepatic Regeneration

Gastroenterol., 60, (1971), 749

Quastler, H.

The Analysis of Cell Population Kinetics

in : L.F. Lamerton, R.J.M. Fry (eds), Cell proliferation,

Oxford, Blackwell Scientific Publications 1963

Rabes, H.

Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum

Veröff. morph. Path. 73, (1967), 1-125

Rabes, H. und Tuczek, H.V.

Topik der DNS-Synthese nach Teilhepatektomie

Naturwiss. 54, (1967), 229-230

Rabes, H. und Tuczek, H.V.

Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie

Virchows Arch. Abt.B Zellpath. 6, (1970), 302-312

Rabes, H. and Brändle, H.

Synthesis of RNA, protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy

Cancer Res. 29, (1969), 817-822

Rabes, H., Wirsching, R., Tucek, H.V.

Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie

Naturwiss. 59, (1972), 221-222

Rabes, H.M., Wirsching, R., Tucek, H.V., and Iseler, G.

Analysis of Cell Cycle Compartments of Hepatocytes after Partial Hepatectomy

Cell Tissue Kinet., 9, (1976), 517-513

Rabes, H.M., G. Iseler, S.Czichos and H.V. Tucek

Synchronization of Hepatocellular DNA-Synthesis in Regenerating Rat Liver by Continuous Infusion of Hydroxyurea

Cancer Res. 37, (1977), 1105 -1111

Rajewsky, M.F.

Synchronisation in vivo : Kinetics of a Malignant Cell System Following Temporary Inhibition of DNA Synthesis with Hydroxyurea

Exptl. Cell Res., 60, (1970), 269-276

Reichard, P. and Estborn, B.

Utilization of Desoxyribosides in the Synthesis of Polynucleotides

J. biol. Chem. 188, (1951), 839-846

Richman, R.A., Claus, T.H., Pilgis, S.J., and Friedman, D.L.

Hormonal Stimulation of DNA Synthesis in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes

Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 73, No.10, (1976), 3589-3593

Rixon, R.H. and Whitfield, J.F.

Parathyroid Hormone : A Possible Initiator of Liver Regeneration

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141, (1972), 93-97

Robbins, E. and Borun, T.W.

The Cytoplasmic Synthesis of Histones in HeLa Cells and its Temporal Relationship to DNA Replication

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, (1967), 409

Rubini, J.R., Crokite, E.P., Bond, V. P. and Fliedner, T.M.

The Metabolism and Fate of Tritiated Thymidine in Man

J.clin. Invest., 39, (1960), 909-918

Rueckert, R.R., and Mueller, G.C.

Studies on Unbalanced Growth in Tissue Culture. I. Induction and Consequence of Thymidine Deficiency

Cancer Res., 20, (1960), 1584-1591

Sakai, A.

Humoral Factor Triggering DNA-Synthesis after Partial Hepatectomy in the Rat

Nature, 229, (1970), 1186-1187

Schimassek, H.

Perfusion of Isolated Rat Liver with a Semi-Synthetic Medium and Control of Liver Function

Life Sciences 11, (1962), 629

Schimassek, H.

Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Leber

Biochem. Z. 336, (1963), 460

Scholz, R., Bücher, Th.

Hemoglobin-free Perfusion of Rat Liver

In : Control of energy metabolism

Ed.B. Chance, Academic Press, New York, p.393, (1965)

Scholz, R.

Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung

Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität München (1967)

Scholz, R., Hansen, W. and R.G. Thurman

Interaction of Mixed-Function Oxydation with Biosynthetic Processes

I. Inhibition of Gluconeogenesis by Aminopyrine in Perfused Rat Liver

Eur J. Biochem. 38, (1973), 64-72

Schultze, B.

Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In : Handbuch der allg. Pathologie II/5, 466-670

Springer, Berlin-Heidelberg-NewYork (1968)

Schultze, B. Oehlert, W.

Autoradiographic Investigation of Incorporation of 3-H-Thymidine into Cells of the Rat and Mouse

Science, 131, (1960), 737-738

Schwartz, H.S., Garofalo, M., Sternberg, S.S., and Philips, F.S.

Hydroxyurea · Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Regenerating Liver of Rats

Cancer Res. , 25, (1965), 1867-1870

Short, J., R.F.Brown, A. Husakova, J.R.Gilbertson, R.Zemel, I.Liebermann
Induktion of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Liver of Intakt Animal
J. Biol. Chem. 247, No. 6, (1972), 1757-1766

Sigel, B., Acevedo, F.J. and Dunn, M.R.
The Effect of Partial Hepatectomy on Autotransplanted Liver Tissue
Surg. Gynec. Obstet., 29, (1963), 117

Sinclair, W.K.
Hydroxyurea : Differential Lethal Effects on Cultured Mammalian Cells during
the Cell Cycle
Science, 150, (1965), 1729-1731

Skoog, K.L., Nordenskjöld, B.A. and Bjursell, K.G.
Deoxyribonucleoside-Triphosphate Pools and DNA-Synthesis in Synchronized
Hamster Cells
Eur. J. Biochem. , 33, (1973), 428-432

Starzl, T.E., Francavilla, A., Halgrimson, C.G., Francavilla, F.R., Porter,
K.A., Brown, T.H. and Putnam, C.W.
The Origin, Hormonal Nature, and Action of Hepatotrophic Substances in
Portal Venous Blood
Surg. Gynecol. Obstet. 137, (1973), 179-199

Steel, G.G., Lamerton, L.F.
The Turnover of Tritium from Thymidine in Tissues of the Rat
Exp. Cell Res. 37, (1965), 117-131

Stöcker, E. und Altmann, H.-W.
Die DNS-Synthese in Leberparenchymzellen und Gallengangsepithelien von
normalen und mit Thioacetamid behandelten Ratten
Naturwiss. 51, (1964), 15

Stöcker, E.

Der Proliferationsmodus in Niere und Leber

Verh. d. Dtsch. Ges. F. Pathol., 50, (1966), 53-74

Stone, G.E., Miller, O.L. and Prescott, D.M.

H-3-thymidine Derivate Pools in Relation to Macronuclear DNA-Synthesis in
Tetrahymena Pyriformis

J. Cell Biol. 25, (1965), 171-177

Stubblefield, E. and Mueller, G.C.

Molecular Events in the Reproduction of Animal Cells. II. The Focalized Synthesis
of DNA in the Chromosomes of HeLa Cells

Cancer Res. 22, (1962), 1091

Thrower, S., and M.G. Ord

Hormonal Control of Liver Regeneration

Biochem. J. 144, (1974), 361-369

Tuczek, H.-V. und Rabes, H.

Autoradiographische und biochemische Untersuchungen zum Übertritt der Hepatozyten
von der G₁ in die S-Phase nach partieller Hepatektomie

Z. Zellforsch. 142, (1973), 399-408

Turkington, R.W., and Hilf, R.

Hormonal Dependence of DNA Synthesis in Mammary Carcinoma Cells in vitro

Science, 160, (1968), 1457-1459

Walters, R.A., Tobey, R.A., and Ratliff, R.L.

Cell-Cycle-Dependent Variations of Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools
in Chinese Hamster Cells

Biochim. Biophys. Acta, 319, (1973), 336-347

Walters, R.A., Tobey, R.A., and Hildebrand, C.E.

Hydroxyurea Does Not Prevent Synchronized G₁ Chinese Hamster Cells From Entering the DNA Synthetic Period

Biochemical and Biophysical Res. Communications, 69, No.1, (1976), 212

Warburg, O.

Versuche an überlebendem Carcinomgewebe

Biochem. Z., 142, (1923), 317

Warburg, O.

Chemische Konstitution von Fermenten

Erg. Enzymforschung, 7, (1938), 210

Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Srivastana, S.K.

Hormonal Induktion and Suppression of Liver Enzyme Biosynthesis

Fed. Proc. 24, (1965), 745

Weger, G.

Hormonal Regulation and Liver Enzymes

Gastroenterol., 53, (1967), 984

Wegener, K., Hollweg, S., and Maurer, W.

Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit und anderer

Teilphasen des Zell-Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte

Z. Zellforsch. 63, (1964), 309-326

Weinbren, K.

Regeneration of the Liver

Gastroenterol., 37, (1959), 657-668

Weissmann, S.M., Smellie, R.M.S., and Paul, J.

Studies on the Biosynthesis of Deoxyribonucleic Acid by Extracts of Mammalian Cells.

IV. The Phosphorylation of Thymidine

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 45, (1960), 101-110

Wilson, J.G., Scott, W.J., Ritter, E.J., and Fradkin, R.

Comparative Distribution and Embryotoxicity of Hydroxyurea in Pregnant Rats and Rhesus Monkeys

Teratology, 11, (1975), 169-178

Wimber, D.E., and Quastler, H.

A C¹⁴ - and H³ -thymidine Double Labeling Technique in the Study of Cell

Proliferation in Tradescantia Root Tips

Exp. Cell Res., 30, (1963), 8-22

Wirsching, R.

Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Kinetik d. Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie

Inaugural-Dissertation, München 1974

Wrba, H., und Rabes, H.

Das Fortbestehen in vivo ausgelöster Wachstumsvorgänge an explantierten Organen

Naturwiss. 48, (1961), 648

Wrba, H., Rabes, H., Ripoll-Gomez, M., and Ranz, H.

Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Serum teilhepatektomierter Tiere auf Leberkulturen.

Exp. Cell Res., 26, (1962), 70- 77

Wrba, H., Rabes, H., Merker, K.F. und Doerr, P.

Zur Bedeutung des O_2 -Partialdruckes für die quantitative Bestimmung des Einbaues von radioaktiv markierten Verbindungen in Organexplantate

Exp. Cell Res. 45, (1966), 167-177

Young, C.W., and Hodas, S.

Hydroxyurea : Inhibitory Effect on DNA Metabolism

Science, 146, (1964), 1172-1174

Young, C.W., Schochetman, G., and Karnofsky, D.A.

Hydroxyurea-Induced Inhibition of Deoxyribonucleotide Synthesis : Studies in Intact Cells

Cancer Res., 27, (1967), 526-534

Zimmer, P.

Der Malat-Aspartat-Zyklus , ein Mechanismus für den Transport von reduzierenden Äquivalenten zwischen Zytosol und Mitochondrien

Inaugural-Dissertation, München 1973

Lebenslauf

Am 22. Mai 1950 wurde ich als Sohn der Eheleute Josef-Alexander und Martha Galosi in Roubaix geboren. Von 1956 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Göggingen bei Augsburg, anschließend in Augsburg das Jakob-Fugger-Gymnasium, wo ich im Juli 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Medizinstudium an der Ludwigs-Maximilians-Universität, wo ich im April 1972 die naturwissenschaftliche und im Oktober 1973 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Sommersemester 1974 begann ich bei Professor H.M. Rabes mit Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation.

Neben meiner wissenschaftlichen Tätigkeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse der klinischen Semester, zudem arbeitete ich im Rahmen der Famulatur an der II. Medizinischen Universitätsklinik, an der Dermatologischen Klinik und an der von Hauner'schen Kinderklinik in München.

Am 8. Dezember 1976 bestand ich in München nach 11 Fachsemestern das medizinische Staatsexamen. Seit Mai 1977 bin ich als Medizinalassistent tätig.

